



Université de Montréal

Évaluation de l'acquisition de la résistance à la colistine chez *Escherichia coli* O149 chez le porc.

par WILLIAM THÉRIAULT

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Avril 2015

©William Thériault, 2015

## Résumé

La diarrhée post-sevrage est une maladie d'importance dans l'industrie porcine et est principalement causée *Escherichia coli* O149. Le traitement habituellement utilisé est la néomycine. Cependant, en raison de l'antibiorésistance, les vétérinaires se tournent vers la colistine sulfate (CS). La CS lie les lipopolysaccharides (LPS) et provoque un déplacement des cations divalents causant la formation de pores entraînant la mort cellulaire. Le système à deux composantes PmrA/PmrB est le plus incriminé dans la résistance à la colistine en ajoutant un groupement 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) au lipide A des LPS, augmentant ainsi la charge du LPS et diminuant son affinité pour la CS. L'objectif principal est d'évaluer l'acquisition de la résistance à la CS d'*E. coli* *in vitro* et dans un modèle *in vivo*. Nous avons utilisé des souches associées à des cas cliniques d'*E. coli* O149 et avons créé 22 mutants résistants à la CS. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été mesurée par une méthode de double dilution et comparée au seuil de résistance. Suite au séquençage des gènes *pmrA/pmrB*, nous avons identifié sept nouveaux polymorphismes, trois dans PmrA : A80V, N128I, S144G et quatre dans PmrB : V87E, D148Y, D148V et T156M. Pour l'essai *in vivo*, nous avons suivi une souche expérimentale ETEC:F4 (*E. coli* O149) et isolé des *E. coli* de la flore commensale. Le séquençage des gènes *pmrA* et *pmrB* de ces isolats a montré un polymorphisme spécifique, G15R et T156M respectivement. Cependant, plusieurs souches récoltées possédaient une résistance à la CS, mais sans polymorphisme de PmrA/PmrB, suggérant d'autre(s) mécanisme(s) de résistance.

Mots Clef : *E. coli*; polymorphisme génétique; colistine; polymyxine E; PmrA/PmrB; système à deux composantes; antibiorésistance; diarrhée post-sevrage; porc

## Abstract

Post-weaning diarrhea is an important swine disease in Québec mainly caused by *Escherichia coli* O149. The most frequent treatment used is neomycin, but due to antimicrobial resistance to this antibiotic, veterinarians often use colistin sulfate (CS). CS binds the lipopolysaccharides (LPS) and causes a displacement of divalent cations causing pore formation in the membrane, leading to cellular death. The two component system PmrA/PmrB is the most frequently associated with CS resistance in *E. coli* by adding a L-Ara4N group to the LPS, increasing its charge, reducing affinity for CS. The main objective of this study was to investigate the genetic polymorphism in *pmrA/pmrB* genes in *E. coli* strains acquired *in vitro* and in an infectious model of post-weaning diarrhea in piglets. For the *in vitro* assay, we used swine clinical *E. coli* strains resistant to neomycin isolated from 2008 to 2011. We created 22 mutants resistant to CS. MIC was determined by standard double dilution method and compared to the EUCAST breakpoint. By sequencing the genes *pmrA* and *pmrB*, we identified seven new genetic polymorphisms, 3 were in PmrA: A80V, N128I, S144G and 4 in *pmrB* gene: V87E, D148Y, D148V, T156M. For the *in vivo* assay, we followed the experimental infection ETEC:F4 *E. coli* strain and commensal *E. coli* isolates through a post-weaning infectious model. Sequencing of *pmrA* and *pmrB* showed two polymorphisms G15R and T156M, respectively. Many *E. coli* strains acquired *in vitro* and *in vivo* resistance to colistin without mutation in *pmrA/pmrB* suggesting other(s) mechanism(s) of resistance to this antibiotic.

Keys words: *E. coli*; post weaning diarrhea; swine; colistin; polymyxine E; PmrA/PmrB; two components system; antimicrobial resistance; genetic polymorphism

## Table des Matières

Résumé.....	ii
Abstract .....	iii
Table des Matières .....	iv
Liste des tableaux .....	vi
Liste des Figures .....	vii
Liste des sigles et abréviations .....	ix
<i>Dédicace</i> .....	xi
<i>Remerciements</i> .....	xii
Introduction .....	1
Recension de la littérature .....	5
<i>Escherichia coli</i> .....	6
Généralités.....	6
STEC : <i>E. coli</i> producteur de shiga toxine .....	8
EPEC : <i>E. coli</i> Entéropathogènes .....	9
ETEC : <i>E. coli</i> Entérotoxinogènes.....	9
La diarrhée post-sevrage .....	10
Facteurs de virulence : Fimbriae et adhésines .....	10
Entérotoxines.....	13
Pathogénie et mécanisme d'infection .....	17
Traitement de la diarrhée post-sevrage.....	19
Les antibiotiques .....	20
Les inhibiteurs de la paroi cellulaire .....	22
Les inhibiteurs de la synthèse protéique.....	23
Les inhibiteurs de la réplication de l'ADN.....	24
Mécanismes généraux d'antibiorésistance .....	25
Néomycine .....	27
Généralités.....	27
La néomycine en usage vétérinaire .....	28
Synthèse protéique .....	31
Néomycine mécanisme d'action.....	33
Néomycine mécanisme de résistance .....	35
Pratique vétérinaire au Québec.....	38
Utilisation hors étiquette ou hors homologation.....	39
Colistine .....	41
Historique.....	41

Utilisation en médecine vétérinaire .....	42
Structure .....	44
Mécanisme d'action « classique » .....	46
« Nouveau » mécanisme d'action .....	50
Mécanisme de résistance .....	51
Régulation de la modification du LPS par PmrAB .....	53
Résumé du mécanisme de résistance .....	56
Problématique .....	59
Méthodologie et Résultats .....	60
Abstract .....	62
Introduction .....	63
Materials & methods .....	66
Results .....	72
Discussion .....	74
Acknowledgment .....	76
Funding .....	76
Tables .....	77
Discussion générale .....	80
Conclusion et perspectives .....	91
Bibliographie .....	xiii
Annexes .....	xxvi

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine.

Table II : Characterization of clinical selected swine strains of *E. coli* 0149 through 2008 to 2011.

Table III : *In vitro* mutants selection and characterization of their resistance to colistin.

Table IV : *E. coli* isolates recovered after an experimental infection and characterization of their resistance to colistin.

Tableau V : Le code d'acide aminé

## Liste des Figures

Figure 1 : Résumé du mécanisme d'action de la toxine STa.

Figure 2 : Résumé du mécanisme d'action de la toxine STb.

Figure 3 : Résumé du mécanisme d'action de la toxine LT.

Figure 4 : Résumé d'une infection d'une cellule épithéliale intestinale par un ETEC.

Figure 5 : Résumé du cycle d'infection des ETEC dans l'animal.

Figure 6 : Illustration montrant l'absence de nouvelles découvertes dans le domaine des antibiotiques.

Figure 7 : Pourcentage de résistance à la néomycine chez des ETECs causant de la diarrhée chez le porc âgé de 22 à 89 jours.

Figure 8 : Les principales étapes de la traduction chez les procaryotes.

Figure 9 : Représentation de la néomycine et autres aminoglycosides. Ils partagent une structure semblable.

Figure 10 : Structure de la colistine et du colistiméthate sodique.

Figure 11 : Structure détaillée de la membrane des bactéries à Gram négatif.

Figure 12 : Mécanisme d'action « classique » des peptides antimicrobiens.

Figure 13 : Photo de microscopie électronique à transmission de *Pseudomonas aeruginosa*.

(A) non traité à un grossissement de 74 000 x (B) traité avec 25 µg de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 74000x (C) traité avec 25 µg de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 190000x.

Figure 14 : Biosynthèse du L-Ara4N et son attachement au lipide A

Figure 15 : Modèle d'interaction entre les systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB chez *S.typhimurium* et *E. coli*.



Figure 16 : Les différentes enzymes responsables de la modification du LPS régulée par PmrA.

Figure 17 : Polymorphisme dans différent domaines des protéines PmrA et PmrB pour quatre bactéries; A : *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, B : *Klebsiella pneumoniae*, C : *Acinetobacter baumannii*, D : *Pseudomonas aeruginosa*.

## Liste des sigles et abréviations

°C : Degré Celsius  
 µg : Microgramme  
 ADN : Acide désoxyribonucléique  
 Al<sup>3+</sup> : cations trivalents aluminium  
 AMP : Adénosine monophosphate  
 AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
 APEC : *E. coli* pathogènes des espèces aviaires  
 APZEC : Animal pathogenic and zoonotic *E. coli*  
 ARN : Acide ribonucléique  
 ARNm : ARN messenger  
 ARNr : ARN ribosomal  
 ARNt : ARN de transfert  
 Ca<sup>2+</sup> : Cation divalent calcium  
 CaCO<sub>3</sub> : Carbonate de calcium  
 CgFARAD: Canadian Global Good Animal Residu Avoidance Databank  
 Cl<sup>-</sup> : Anion chlore  
 CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute  
 CMI : Concentration minimale inhibitrice  
 CS : Colistine sulfate  
 Da : Dalton  
 DAB : γ-diaminobutyrique  
 DAEC : *E. coli* diffus adhérents  
 EAEC : *E. coli* entéroaggrégatifs  
 EDR : Emergency Drug Release  
 EHEC : *E. coli* entérohémorragiques  
 EIEC : *E. coli* entéroinvasifs  
 EPEC : *E. coli* entéropathogéniques  
 ESVAC : European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption  
 ETEC : *E. coli* entérotoxinogènes  
 EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
 ExPEC : *E. coli* pathogènes extraintestinaux  
 Fe<sup>3+</sup> : cation trivalent fer  
 g : gramme  
 GMP: Guanosine monophosphate  
 GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
 H<sub>2</sub>S : Sulfure d'hydrogène

kDa : kilodalton  
kg : Kilogramme  
L : Litre  
L-Ara4N : 4-amino-4déoxy-L-arabinose  
LB : Lysogeny broth  
LPS : Lipopolysaccharides  
LT : Toxine thermolabile  
mg : Milligramme  
 $Mg^{2+}$  : Cation divalent magnésium  
MH : Muller Hinton  
MIC : Minimal inhibitrice concentration  
MNEC : *E. coli* causant des méningites et septicémies  
 $Na^{+}$  : Cation sodium  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pEtN : Phosphoéthanolamine  
pH : Potentiel hydrogène  
RPM : Tour par minute (tr/mn)  
*Spp* : Espèce  
ST : Toxine thermostable  
STEC : *E. coli* producteurs de shiga toxine  
Stx : Shiga toxine  
ufc /cfu : Unité formatrice de colonie  
UI : Unité internationale  
UPEC : *E. coli* uropathogènes

*Dédicace*

*Science: The final frontier.*

*These are the works of William Thériault.*

*His four-year mission:*

*to explore strange new worlds;*

*to seek out new knowledge and new information;*

*to boldly go where no man has gone before.*

*Remerciements*

J'aimerais remercier ma directrice Dre Ann Letellier, pour m'avoir donné l'opportunité, la chance et le privilège de travailler sous sa direction.

J'aimerais remercier mes codirectrices Dre Marie Archambault et Dre Sylvette L-Lewandowski pour leurs précieux conseils et supports tout au long du projet.

J'aimerais remercier mes collègues, maintenant amis, de la Chaire de recherche en salubrité des viandes pour leur aide, leur précieux conseils et leur soutien.

J'aimerais remercier les membres de mon comité-conseil ainsi que les membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

J'aimerais remercier les organismes subventionnaires de ce projet : la Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV); le Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) sans qui ce projet n'aurait pas eu lieu.

J'aimerais finalement remercier, mes parents (Danielle et Robert), mon frère (Elliot) et ma conjointe (Jessica) pour leurs encouragements constants tout le long de mon cursus universitaire.

# Introduction

La diarrhée post-sevrage est une maladie de haute importance au Québec. Le principal agent infectieux de cette maladie est *Escherichia coli* O149 (Fairbrother *et al.* 2005, Jamalludeen *et al.* 2007). Le traitement habituellement utilisé par les vétérinaires-praticiens est la néomycine. Cependant, due à l'antibiorésistance à la néomycine, près de 40 % des traitements sont rapportés comme étant inefficaces (Maynard *et al.* 2003). Toutefois, ce phénomène n'est pas seulement observé au Québec, mais un peu partout dans le monde (Smith *et al.* 2010, Malik *et al.* 2011, Luppi *et al.* 2015). Chez les isolats de *E. coli*, le mécanisme de résistance à la néomycine le plus souvent incriminé est la modification enzymatique de l'antibiotique soit par acétylation soit par phosphorylation. Trois gènes, *acc(3)-IV*, *apk(3')-I*, *apk(3')-II*, sont les plus souvent associés à la résistance à la néomycine et les plus souvent retrouvés sur des éléments mobiles comme des intégrons, des transposons et des plasmides conjugatifs (Ramirez and Tolmasky 2010).

Afin de contourner cette situation d'antibiorésistance, les vétérinaires-praticiens se tournent vers la colistine sulfate (CS), un antibiotique de la famille des polymyxines également appelées polymyxine E. Bien que la CS semble efficace sur le terrain pour traiter les infections à *E. coli*, la CS est un produit non homologué au Canada en production porcine (Compendiums 2015). Dans d'autres pays, la CS est recommandée comme traitement oral des infections intestinales chez le porc (Kempf *et al.* 2013). Cet antibiotique est produit par *Bacillus polymyxa subsp. colistinus* et était utilisé en médecine humaine durant les années 1960. Cependant, dû à un fort taux de toxicité chez l'homme, la CS fut vite remplacée au début des années 1970. Récemment, due à l'absence de nouveaux antibiotiques, il devient de plus en plus difficile de traiter les infections humaines aux bactéries à Gram négatif

multirésistantes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*. Pour ces raisons, nous assistons à une réémergence des usages de la CS en médecine humaine. Récemment, Santé Canada a également classé cet antibiotique comme étant de très haute importance en santé humaine (Government of Canada 2012) suggérant que son usage en médecine vétérinaire n'est pas approprié.

La CS possède une activité bactéricide contre les bactéries à Gram négatif, plus précisément les Entérobactéries à l'exception des genres *Proteus* spp., *Serratia* spp. et *Providencia* spp. (Falagas *et al.* 2010). Elle lie les lipopolysaccharides (LPS) grâce à ses charges positives. Le LPS étant chargé négativement, il y a interaction et liaison de ces deux composés (Clausell *et al.* 2007, Falagas *et al.* 2010). Cette interaction provoque un déplacement des cations divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ . Ce déplacement provoquera la formation de pores dans la membrane, entraînant ainsi le relargage du contenu intracellulaire et résultera en la mort de la cellule.

Les mécanismes de résistance à la colistine varient selon le micro-organisme. Par exemple, on retrouve des pompes à efflux chez *Yersinia pestis*, la production de capsule chez *Klebsiella pneumoniae*, et la modification du LPS chez *Salmonella enterica* et *E. coli* (Bengoechea and Skurnik 2000, Campos *et al.* 2004, Falagas *et al.* 2010). Cette modification du LPS est régulée par les systèmes à deux composantes PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (Kempf *et al.* 2013). Le système PhoP/PhoQ est associé à une diminution de la concentration de  $Mg^{2+}$  dans l'environnement, en conséquence, il régule le système PmrA/PmrB par PmrD. PmrD inhibe la déphosphorylation de PmrA activant ainsi la transcription des gènes de l'opéron *arn* anciennement appelé l'opéron *pmr* (Winfield and Groisman 2004, Falagas *et al.* 2010). La transcription de ces gènes entraîne l'addition d'un



groupement 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) au niveau du lipide A du LPS. Ce groupement vient neutraliser la charge du LPS réduisant ainsi son affinité pour la colistine (Kline *et al.* 2008, Kempf *et al.* 2013). PmrD est présent chez *E. coli*, mais ne semble pas impliqué dans la liaison des 2 systèmes. PmrB est un récepteur transmembranaire avec une fonction histidine kinase qui est activé par une forte concentration de l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Winfield and Groisman 2004). Ce récepteur phosphoryle PmrA, qui est le facteur de transcription, ce qui résulte en la transcription des gènes de l'opéron *arn*. Chez d'autres entérobactéries, il a été rapporté qu'une mutation dans les gènes de *pmrA* et *pmrB* pouvait entraîner l'activation continue de ce système menant à la résistance à la colistine (Gunn *et al.* 1998, Falagas *et al.* 2010, Kempf *et al.* 2013). Seulement 3 polymorphismes génétiques des gènes *pmrA* et *pmrB* ont été rapportés chez *E. coli* (Quesada *et al.* 2015). Il s'agit de l'une des rares études à avoir évalué la résistance à la colistine *in vivo* puisqu'il s'agit d'un événement rare.

L'objectif principal de cette étude est de d'étudier l'acquisition de la résistance à la CS par le système à deux composantes PmrA/PmrB. Pour répondre à cet objectif, nous allons, tout d'abord, établir une banque de souches d'*E. coli* O149 résistant à la néomycine et sensibles à la colistine provenant de cas cliniques de diarrhée post-sevrage. Par la suite, à l'aide de cette banque de souches, nous allons créer des mutants et vérifier l'acquisition de la résistance *in vitro*. Pour terminer, nous allons investiguer l'acquisition de la résistance chez divers isolats d'*E. coli* dans un modèle d'infection expérimentale chez le porcelet. Cette étude est l'une des rares à avoir documenté l'acquisition de la résistance à la CS à la fois *in vitro* et sur des souches d'*E. coli* causant la diarrhée post-sevrage sur des isolats provenant de porcs ayant reçu la colistine, donc *in vivo*.

## **Recension de la littérature**

## ***Escherichia coli***

### **Généralités**

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, anaérobie facultatif, en forme de bâtonnet, possédant des flagelles péricritiques et pouvant fermenter le lactose. Cette caractéristique lui confère une morphologie de large colonie rose sur gélose MacConkey. Les autres propriétés biochimiques qui peuvent permettre de la différencier sont la production d'indole en présence de tryptophane, l'absence d'uréase et de production de H<sub>2</sub>S et l'incapacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone (Kaper *et al.* 2004).

*E. coli* est une bactérie anaérobie facultative naturellement présente dans le tube digestif des humains et des mammifères. On la retrouve au niveau du petit intestin avec des concentrations faibles, qui augmentent progressivement, pour atteindre des concentrations de 10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> ufc/g de matières fécales dans le colon (Kaper *et al.* 2004, Gyles and Fairbrother 2009). *E. coli* est un féroce compétiteur, au niveau du tube digestif, pour prévenir l'adhésion de bactéries potentiellement pathogènes. Dans la majorité des cas, les *E. coli* sont des commensaux. Ces bactéries vivent en symbiose avec l'hôte sans lui causer d'effets indésirables et contribuent au maintien d'un écosystème microbien stable. Seulement une faible proportion des souches d'*E. coli* est pathogène. Ces *E. coli* pathogènes, ont acquis des facteurs de virulence, toxines ou adhésines, qui leur donnent un avantage dans d'autres niches écologiques, causant de ce fait certaines maladies (Kaper *et al.* 2004). Ces facteurs de virulence sont souvent portés sur des éléments génétiques mobiles, pouvant se propager par transmission horizontale (d'une bactérie à une autre) assurant ainsi la dissémination de ces facteurs de virulence et pouvant créer une multitude

de combinaison de ces facteurs au sein du génome. Seulement les combinaisons les plus efficaces demeurent et confèrent ainsi aux *E. coli* des pathotypes spécifiques (Kaper *et al.* 2004, Gyles and Fairbrother 2009).

Chez l'animal, il est possible de distinguer trois types d'infections distinctes reliées à des pathotypes : les infections entériques, les infections urinaires et les septicémies/méningites. Chez les *E. coli* entériques pathogènes, il y a sept catégories de pathotypes : les *E. coli* Entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* producteurs de shiga toxine (STEC), les *E. coli* Entéropathogéniques (EPEC), les *E. coli* Entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* Entéroaggrégatives (EAEC), les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC) et les *E. coli* diffus adhérents (DAEC). Il existe également des *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC) qui incluent les *E. coli* uropathogènes (UPEC) lesquels sont associés aux infections du système urinaire, les *E. coli* (MNEC) qui causent des méningites et des septicémies et les *E. coli* pathogènes des espèces aviaires (APEC) responsables d'infections respiratoires, de péricardites et de septicémies chez la volaille (Kaper *et al.* 2004, Gyles and Fairbrother 2009, Clements *et al.* 2012).

En plus des pathotypes précédemment énumérés, une différenciation en sous-type par sérotypage est importante pour différencier les souches pathogènes des non pathogènes ainsi que pour les études épidémiologiques. Quatre principaux antigènes de surface sont utilisés pour faire le classement des sous-types : l'antigène O qui est relié à la portion saccharidique du LPS, l'antigène H qui est relié aux protéines des flagelles, l'antigène F des fimbriae et l'antigène K représentant la capsule polysaccharidique. Ce dernier n'est cependant plus utilisé en sérotypie. En 2010, on dénombrait 174 sous-types de l'antigène O et 53 sous-types de l'antigène H. La sérologie demeure la technique de base pour la différenciation des

sous-espèces, mais des techniques moléculaires de type PCR existent pour la détection d'antigènes O et H d'importance (Gyles and Fairbrother 2009).

Ce mémoire portera sur les *E. coli* entériques causant des maladies chez l'espèce porcine.

### **STEC : *E. coli* producteur de shiga toxine**

Les STEC sont des *E. coli* qui possèdent la shiga toxine Stx, également appelée vérotoxine. Les STEC sont responsables de la maladie de l'œdème chez le porc. Les principaux facteurs de virulence sont les vérotoxines Stx1 et Stx2. La toxine Stx1 est identique à la toxine présente chez *Shigella dysenteriae*. La toxine Stx2 possède une homologie de 56 % avec la toxine Stx 1 et possède également plusieurs variants. Ces deux toxines sont de type AB avec une sous-unité A de 32 kDa et un pentamère de la sous-unité B de 7,7 kDa chacune. De manière générale, les toxines Stx se lient à la surface des cellules épithéliales de l'intestin et sont internalisées par endocytose. Une fois internalisée, la sous-unité A subit un clivage résultant en 2 sous-unités A1 et A2. La sous-unité A1 est responsable de l'arrêt de la synthèse protéique. Les Stx induisent également la cascade de l'apoptose. En plus des toxines Stx, les STEC possèdent également d'autres facteurs de virulence comme l'hémolysine. Cette dernière aide à la survie des STEC en rendant le fer disponible pour la bactérie par la lyse des érythrocytes. Un autre facteur de virulence est la résistance à l'acide. Cette résistance permettrait à la bactérie de survivre au passage gastrique. Chez le porc, les STEC sont responsables de la maladie de l'œdème par leur adhésion avec le fimbriae F18 à son récepteur, un conjugué glycolisé situé à l'extrémité des villi des cellules épithéliales du petit intestin. Certains porcs peuvent être résistants à la maladie de l'œdème par l'absence de ce récepteur. Un PCR peut être effectué pour déceler une mutation dans le gène 1,2

fucosyl-transférase (FUT1) qui est un précurseur dans la synthèse du récepteur (Kaper *et al.* 2004, Gyles and Fairbrother 2009, Clements *et al.* 2012).

### **EPEC : *E. coli* Entéropathogènes**

Historiquement, les EPEC sont les *E. coli* associés au premier pathotype à avoir été décrit suite à une écloison de diarrhée chez des enfants au Royaume-Uni au début des années 1940. Chez l'espèce porcine, les EPEC causent également de la diarrhée. Ces souches de *E. coli* ont l'habilité de s'adhérer via une liaison d'attachement et d'effacement qui est caractérisée par une destruction des microvillosités et l'attachement à la partie apicale de la cellule épithéliale, souvent associée à une structure de piédestal, et par la formation de larges plaques d'actine sous la bactérie (Kaper *et al.* 2004, Gyles and Fairbrother 2009). Les gènes des principaux facteurs de virulence associés avec la formation de la liaison d'attachement et d'effacement se retrouvent sur un îlot de pathogénicité appelé LEE. La présence d'un autre facteur de virulence, l'intimine est également fréquente chez les EPEC. Chez le porc, au Canada, les EPEC sont associés avec la diarrhée post-sevrage et sont le plus souvent associés au sérotype O45 et 103 (Kaper *et al.* 2004, Dean and Kenny 2009, Gyles and Fairbrother 2009).

### **ETEC : *E. coli* Entérotoxinogènes**

Les ETEC sont la cause la plus commune de diarrhée chez les animaux. Ils sont caractérisés par la production d'adhésines leur permettant d'adhérer à la cellule épithéliale et par la

production d'entérotoxines. Les *E. coli* entérotoxigènes sont la principale cause de diarrhée post-sevrage chez le porcelet (Fairbrother *et al.* 2005).

### **La diarrhée post-sevrage**

Le sevrage chez les porcelets est une période de susceptibilité associée à des changements importants au niveau intestinal. Plusieurs facteurs comme le stress, le changement de diète (lait maternel à une alimentation solide) et l'arrêt de l'apport d'anticorps maternels sont souvent associés au déclenchement de déséquilibres intestinaux tels la diarrhée post-sevrage (Gyles and Fairbrother 2009). Cette diarrhée apparaît habituellement une semaine après le sevrage du porcelet et engendre une perte de poids considérable. Cette maladie est responsable de 2 à 7 % des mortalités et peut représenter des pertes économiques de plus de 20 000 \$ par année pour un élevage de 500 truies. Mondialement les sérogroupes les plus associés à la diarrhée post-sevrage sont : O8, O138, O139, O141, O147, O149 et O157. Au Canada, et plus précisément au Québec, le sérogruppe le plus fréquemment associé à cette condition est le O149 (Maynard *et al.* 2003, Fairbrother *et al.* 2005, Gyles and Fairbrother 2009).

### **Facteurs de virulence : Fimbriae et adhésines**

Les fimbriae sont des structures composées d'une sous-unité majeure retrouvée en une centaine d'exemplaires ou de plusieurs petites sous-unités avec des propriétés distinctes ce qui leur confère leur forme et leurs propriétés antigéniques spécifiques. On les retrouve à la surface des bactéries et ces structures jouent un rôle important dans l'attachement des

bactéries aux cellules de l'hôte lors des premières étapes de l'infection. Les récepteurs de la plupart des fimbriae sont des glycoprotéines retrouvées à la surface des cellules intestinales. Les principaux fimbriae retrouvés chez les ETEC sont F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 et F41 (Gyles and Fairbrother 2009).

Les deux principaux fimbriae les plus souvent incriminés dans les cas de diarrhée post-sevrage sont F4 et F18. Les fimbriae F5, F6 et F41 sont les moins souvent associés à la diarrhée post-sevrage du porcelet. Le F5 est codé par le locus *fan* qui est retrouvé sur un plasmide. Il est constitué d'une sous-unité principale FanC et se lie spécifiquement à son récepteur l'acide GM3 N-glycolylneuraminique dans le petit intestin. Celui-ci est principalement retrouvé dans les cas de diarrhée néonatale chez le porcelet (Fairbrother *et al.* 2005, Gyles and Fairbrother 2009).

Le fimbriae F6 est codé par le locus *fas* qui est retrouvé à la fois sur le chromosome et sur un plasmide. Il est constitué d'une sous-unité principale FasA et de deux sous-unités mineures FasF et FasG. La sous-unité FasG est capable de lier les sulfatides hydroxylés et l'histone H1 des cellules épithéliales intestinales. La sous-unité FasA lie pour sa part les céramides de monohexose. Ces récepteurs sont moins fréquents chez les porcs plus âgés, on retrouve le F6 quasi uniquement dans des cas de diarrhée néonatale du porcelet (Fairbrother *et al.* 2005, Gyles and Fairbrother 2009).

Le fimbriae F41 est codé sur le chromosome des ETEC et est présent chez des souches bovines et porcines uniquement. Il est souvent associé à la présence du F5. Chez le porcelet naissant, F41 provoque la colonisation de la région postérieure du petit intestin.

Le fimbriae F18 est une longue structure codée par le locus *fed* qui se trouve principalement sur des plasmides que l'on peut retrouver chez les STEC et les ETEC. Il existe deux variants



antigéniques de F18 soit F18ab et F18ac. La présence du F18 est intimement liée à la production de toxines comme les toxines thermostables Sta et Stb, la toxine Stx2 et la toxine thermolabile LT. Les gènes codant pour la structure du fimbriae F18 ont été rapportés sur un plasmide codant aussi pour l'adhésine AIDA dans des souches de STEC. Cinq gènes ont été identifiés dans l'opéron du F18 soit : *fedA* la sous-unité principale, *fedB* et *fedC* des protéines usher (huissier) et chaperonne respectivement, *fedE* la sous-unité mineure et *fedF* l'adhésine. Le F18 est associé à la maladie de l'oedème. Le récepteur du F18 est absent chez le porcelet naissant et sa présence augmente au niveau de l'extrémité des villi des cellules épithéliales du petit intestin avec l'âge et demeure présent chez l'adulte. La fréquence à laquelle on retrouve le F18 dans les cas de diarrhée post-sevrage varie en fonction du temps et du pays. Par exemple, au Danemark, 27 % des ETEC isolés de cas de diarrhée post-sevrage contenait le gène *fedA* par comparaison aux résultats de la Caroline du Nord avec 53 %, 7 % en Ontario et 62 % en Pologne (Nagy and Fekete 1999, Fairbrother *et al.* 2005, Gyles and Fairbrother 2009).

Le fimbriae F4 est une structure fine composée d'une seule sous-unité principale FaeG et est codé par le locus *fae* retrouvé sur un plasmide. L'interaction du F4 et de son récepteur se fait au niveau de la cellule épithéliale. La colonisation se fait au niveau de la muqueuse de l'intestin chez le porc de tout âge. On retrouve trois différents variants du fimbriae F4 soit : F4ab, F4ac et F4ad cependant le variant F4ac est le plus fréquemment retrouvé à l'échelle mondiale (Choi and Chae 1999, Alexa *et al.* 2001). Le récepteur du F4 est une sialoglycoprotéine intestinale de type mucine (IMTGP). Cette glycoprotéine est codée sur le chromosome 13 du porc. Le porc peut donc être résistant à la colonisation par un ETEC F4 s'il ne possède pas le gène du récepteur porté par ses allèles. Il est rapporté que les acides

aminés 125 et 168 de la protéine FaeG sont essentiels à l'attachement du fimbriae F4 au récepteur de la cellule. De plus, d'autres facteurs peuvent influencer cette liaison adhésine-récepteur, plus particulièrement, la lactadhérine, les lipases lipoprotéiques, la  $\beta$  caséine et les protéines acides contenues dans le lait porcin peuvent lier le F4 (Fairbrother *et al.* 2005, Gyles and Fairbrother 2009).

En plus des fimbriae, il existe également une adhésine non fimbriaire nommée AIDA-I qui est codée sur un plasmide, possiblement le même plasmide qui code pour le fimbriae F18. Cette adhésine est une protéine du type auto-transporteur qui permet l'attachement aux cellules épithéliales de l'intestin. Il est rapporté que les ETEC possédant les toxines STb ou STb et EAST-1 provenant de diarrhée néonatale ou de diarrhée post-sevrage, peuvent posséder AIDA-I. Cette adhésine est également impliquée dans la formation de biofilm (Gyles and Fairbrother 2009).

Il a également été rapporté que la protéine Paa peut se retrouver chez les ETEC. Cette protéine est principalement retrouvée chez les EPEC. De plus, elle est responsable de la liaison d'attachement et d'effacement. On la retrouve sur un plasmide qui code pour des gènes de résistances aux antibiotiques et pour l'entérotoxine STa. Chez les ETEC, la protéine Paa pourrait jouer le rôle d'adhésine, mais son rôle demeure toutefois peu connu (Fairbrother *et al.* 2005).

## **Entérotoxines**

En ce qui concerne les entérotoxines retrouvées chez les ETEC, il existe deux grandes classes de toxines : les toxines thermostables (ST) résistantes à la chaleur (100 °C pendant

15 minutes) et les toxines thermolabiles (LT) qui sont inactivées par un traitement thermique de 60 °C pendant 15 minutes. Ces toxines sont codées sur des plasmides. Elles produisent un débalancement dans le métabolisme des fluides, mais ne provoquent pas de lésion de l'intestin (Gyles and Fairbrother 2009).

La toxine thermostable STa est une petite protéine de 18 ou 19 acides aminés. Elle est également très résistante aux digestions enzymatiques et à l'acidité. Ceci est dû au fait qu'elle possède trois ponts disulfures. La toxine STa est codée par le gène *estA* et est associée à un transposon qui est porté sur un plasmide qui code également pour des gènes de résistance à la tétracycline. La toxine STa se lie à son récepteur, la guanylyle cyclase C glycoprotéique (GC-C), situé à la surface apicale des cellules intestinales. Suite à la liaison, le récepteur active une guanylate cyclase qui augmente la production de GMP cyclique. L'augmentation de GMP cyclique a pour effet d'activer une protéine kinase GMP cyclique dépendante. Cette dernière entraîne une phosphorylation d'un canal chlorique (CFTR), augmentant ainsi la sécrétion d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  et l'inhibition de l'entrée de cations  $\text{Na}^+$ . L'ensemble de ces modifications entraîne une sécrétion d'eau dans la lumière de l'intestin, ce qui cause la diarrhée (Figures 1 et 4) (Nagy and Fekete 1999, Fairbrother *et al.* 2005, Clements *et al.* 2012).

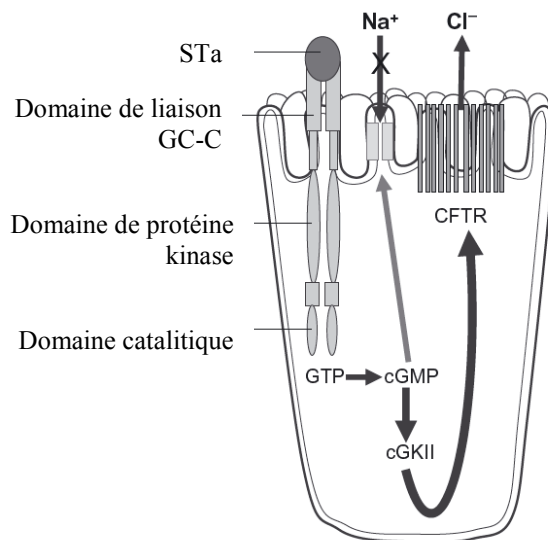


Figure 1 : Résumé du mécanisme d'action de la toxine STa. Adapté de (Gyles and Fairbrother 2009).

La toxine thermostable STb est un peptide de 48 acides aminés et possède deux ponts disulfures résistants à une haute température, mais sensibles à la digestion enzymatique. La toxine STb est retrouvée quasi exclusivement chez les ETEC porcins et cette toxine est le facteur de virulence le plus détecté dans les cas de diarrhée post-sevrage. Le gène codant pour STb est *estB* et il est souvent retrouvé sur un plasmide codant également pour la toxine LT et le fimbriae F4. La toxine STb se lie à son récepteur, un céramide possédant un galactose sulfaté en position 3. Cette liaison entraîne l'entrée de cations  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule, ce qui active une protéine kinase qui à son tour active un canal chlorique (CFTR) par une phosphorylation qui provoque la sécrétion d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ . Une concentration élevée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule augmente la production de prostanglandine E2 et de 5-hydroxytryptamine résultant en une inhibition de l'entrée d'ions  $\text{Na}^{2+}$ , laquelle entraîne la

libération d'eau dans la lumière de l'intestin (Figures 2 et 4) (Nagy and Fekete 1999, Fairbrother *et al.* 2005, Dubreuil 2008, Clements *et al.* 2012).

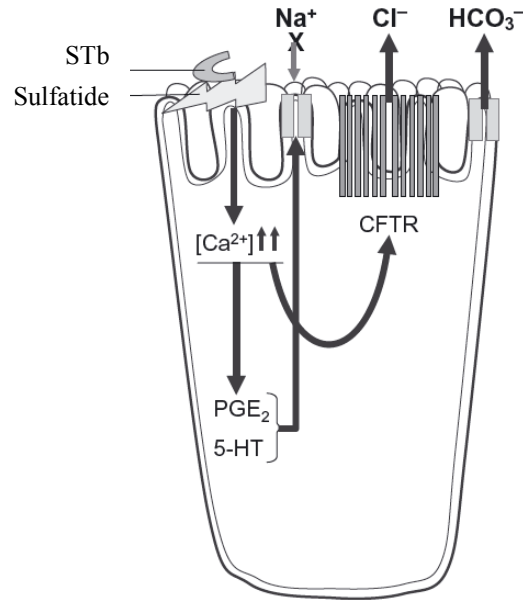


Figure 2 : Résumé du mécanisme d'action de la toxine STb. Adapté de (Gyles and Fairbrother 2009).

Une autre toxine majeure des ETEC est la toxine EAST-1 qui est codée par le gène *astA* retrouvé sur de grands plasmides. EAST-1 est un petit peptide de 38 acides aminés et contient 2 ponts disulfures. Il est rapporté une homologie de 50 % avec la toxine STa et semble avoir le même récepteur soit la guanylyle cyclase C glycoprotéique (GC-C). Elle contribue également à augmenter la concentration de GMP cyclique.

La toxine thermolabile LT est une toxine de type A:B<sub>5</sub> de 84 kDa. La sous-unité A est divisée en deux fragments, A1 qui consiste au site actif de la toxine et le fragment A2 qui est le pont entre le fragment A1 et les cinq sous-unités B. La sous-unité B possède plusieurs récepteurs comme la GD1 ganglioside, GM1, GM2, des galactoprotéines et des glycolipides

contenant du galactose. Une fois liée à son récepteur, la toxine est internalisée par endocytose et transportée à l'appareil de golgi et au réticulum endoplasmique. Suite à une dissociation, le fragment A1 provoque la ribosylation de la protéine G qui engendre l'activation permanente de production d'AMP cyclique. L'augmentation de la concentration de l'AMP cyclique provoque l'activation du canal chlorique CFTR via la phosphorylation de la protéine kinase A résultant en une sécrétion d'ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  et inhibant l'absorption de cations  $\text{Na}^+$  ayant pour effet l'expulsion d'eau dans la lumière de l'intestin (Figures 3 et 4) (Nagy and Fekete 1999, Fairbrother *et al.* 2005, Clements *et al.* 2012).

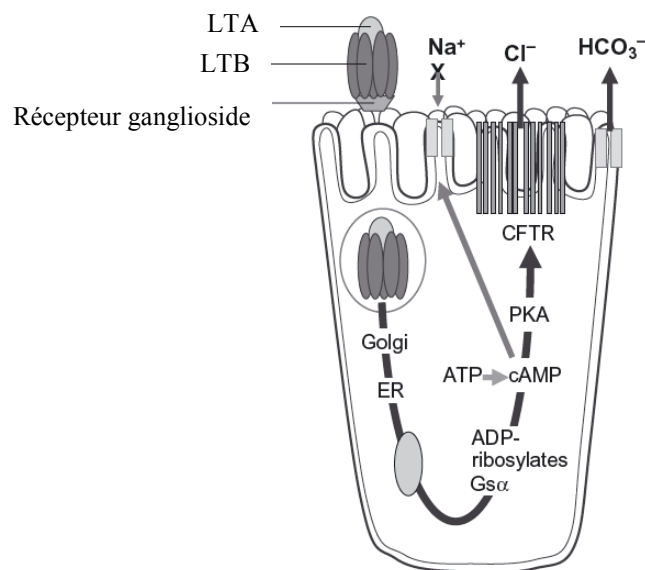


Figure 3 : Résumé du mécanisme d'action de la toxine LT. Adapté de (Gyles and Fairbrother 2009).

### Pathogénie et mécanisme d'infection

L'ingestion d'ETEC présent dans l'environnement du porcelet est la voie d'entrée de la bactérie dans l'organisme du porc. Étant donné que chez le porcelet en bas âge, le pH de

l'estomac et du duodénum est plus élevé (moins acide), les ETEC profitent de cet environnement favorable pour se multiplier rapidement. Les ETEC vont par la suite coloniser le jéjunum et iléon à l'aide de fimbriae et de récepteurs spécifiques situés sur la surface apicale des cellules épithéliales intestinales. Une fois adhérents, les ETEC vont sécréter des toxines qui auront pour effet de produire une sécrétion d'anions et une inhibition de l'entrée de cations  $\text{Na}^+$ , ce qui se traduit par une perte d'eau et d'électrolytes. Cette perte d'eau par les cellules aura un effet direct sur l'apparition de la diarrhée (Figure 5). La diarrhée post-sevrage se présente comme une diarrhée de couleur jaunâtre ou grise qui débute généralement 3 à 5 jours après le sevrage des porcelets. La mortalité associée à cette maladie peut atteindre 25 % sans traitement antibiotique (Fairbrother *et al.* 2005, Gyles and Fairbrother 2009).

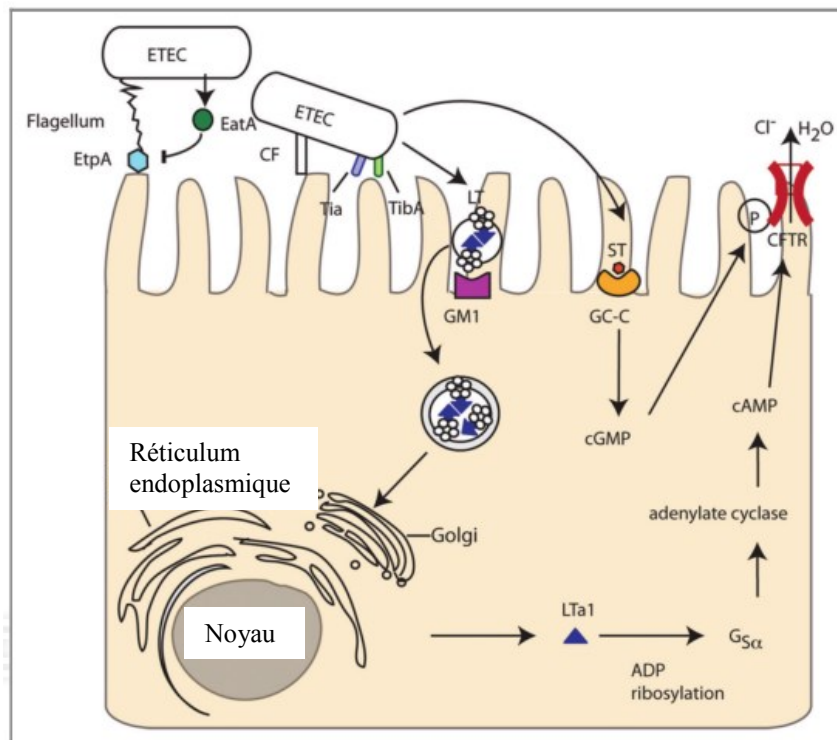


Figure 4 : Résumé d'une infection d'une cellule épithéliale intestinale par un ETEC. Adapté de (Clements *et al.* 2012).

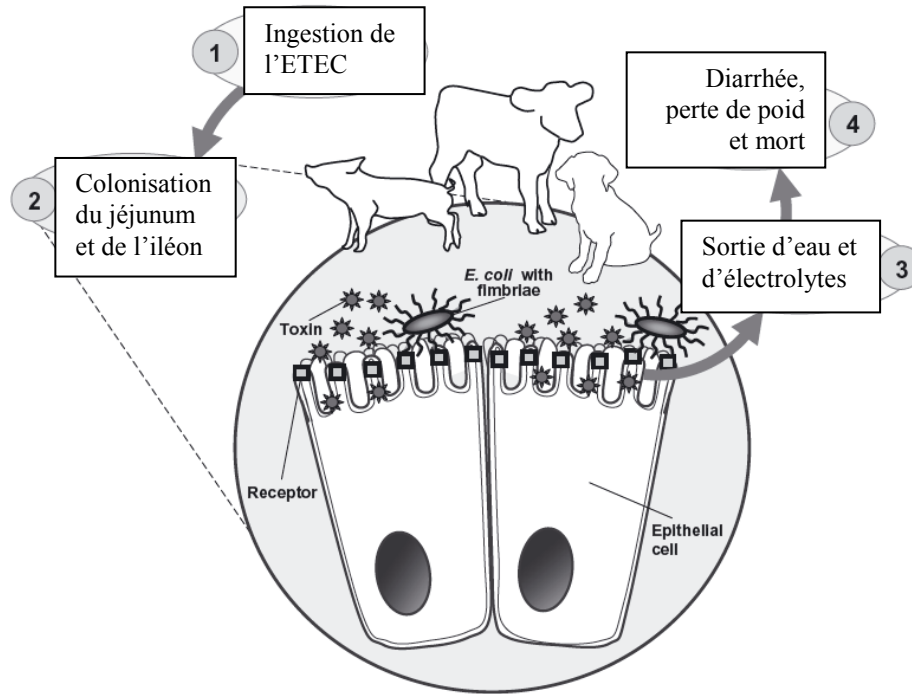


Figure 5 : Résumé du cycle d'infection des ETEC dans l'animal. Adapté de (Gyles and Fairbrother 2009).

### Traitement de la diarrhée post-sevrage

Plusieurs stratégies de contrôle ont été développées ou envisagées afin de réduire ou d'éliminer les ETECs causant la diarrhée chez le porcelet. Parmi celles-ci, on compte; les vaccins, les prébiotiques, les probiotiques, les bactériophages, les molécules chimiques non antibiotiques (zinc, acides organiques et huiles essentielles), l'ajout de poudre d'œuf potentialisée à l'aliment et des modifications dans la régie d'élevage (acidification de l'eau de boisson ou l'ajout de protéine plasmatique à l'aliment). Ces stratégies sont mises en place dans le but de réduire l'utilisation d'antibiotiques et ainsi diminuer l'apparition de



l'antibiorésistance. Les antibiotiques qui sont efficaces pour traiter la diarrhée post-sevrage sont : l'amoxicilline couplée à l'acide clavulanique, les fluoroquinolones, les céphalosporines, les aminoglycosides comme, l'apramycine, et la néomycine, le ceftiofur et le triméthoprim (Fairbrother *et al.* 2005). En pratique, les aminoglycosides sont les plus souvent utilisés. Pour des raisons économiques, la néomycine est l'antibiotique de choix pour traiter les diarrhées post-sevrage causées par les ETECs.

## **Les antibiotiques**

Les antibiotiques sont des molécules capables de tuer (bactéricide) ou d'inhiber la croissance (bactériostatique) des bactéries. Ces molécules sont historiquement synthétisées et isolées de micro-organismes, mais aujourd'hui, la plupart d'entre elles sont synthétisées de manière semi-synthétique ou synthétique. L'un des tout premiers antibiotiques découverts fut la pénicilline en 1928 par Alexandre Fleming (Salyers and Whitt 2002). Depuis cette découverte, plusieurs autres classes d'antibiotiques ont vu le jour. Comme nous le montre la Figure 6, entre les années 1940 et les années 1960, une panoplie de découvertes ont eu lieu. Cependant, il est également possible de constater que depuis 1987, il n'y a eu que très peu de nouvelles molécules qui ont été mises à la disposition des médecins pour traiter les infections bactériennes. On développe cependant des nouvelles générations de classe d'antibiotiques déjà connus (céphalosporines de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> génération) (Silver 2011). Les compagnies pharmaceutiques ne sont plus intéressées à investir des sommes d'argent gigantesques pour le développement d'antibiotiques puisque de nombreuses études cliniques sont nécessaires, et que les brevets viennent à échéance rapidement. D'autres compagnies peuvent ensuite commercialiser la molécule sans avoir à déboursier de grosses sommes d'argent. Les compagnies pharmaceutiques préfèrent investir dans des

médicaments qui sont pris de manière répétée sur une longue période de temps comme le Prozac™ et le Viagra™ (Salyers and Whitt 2002).

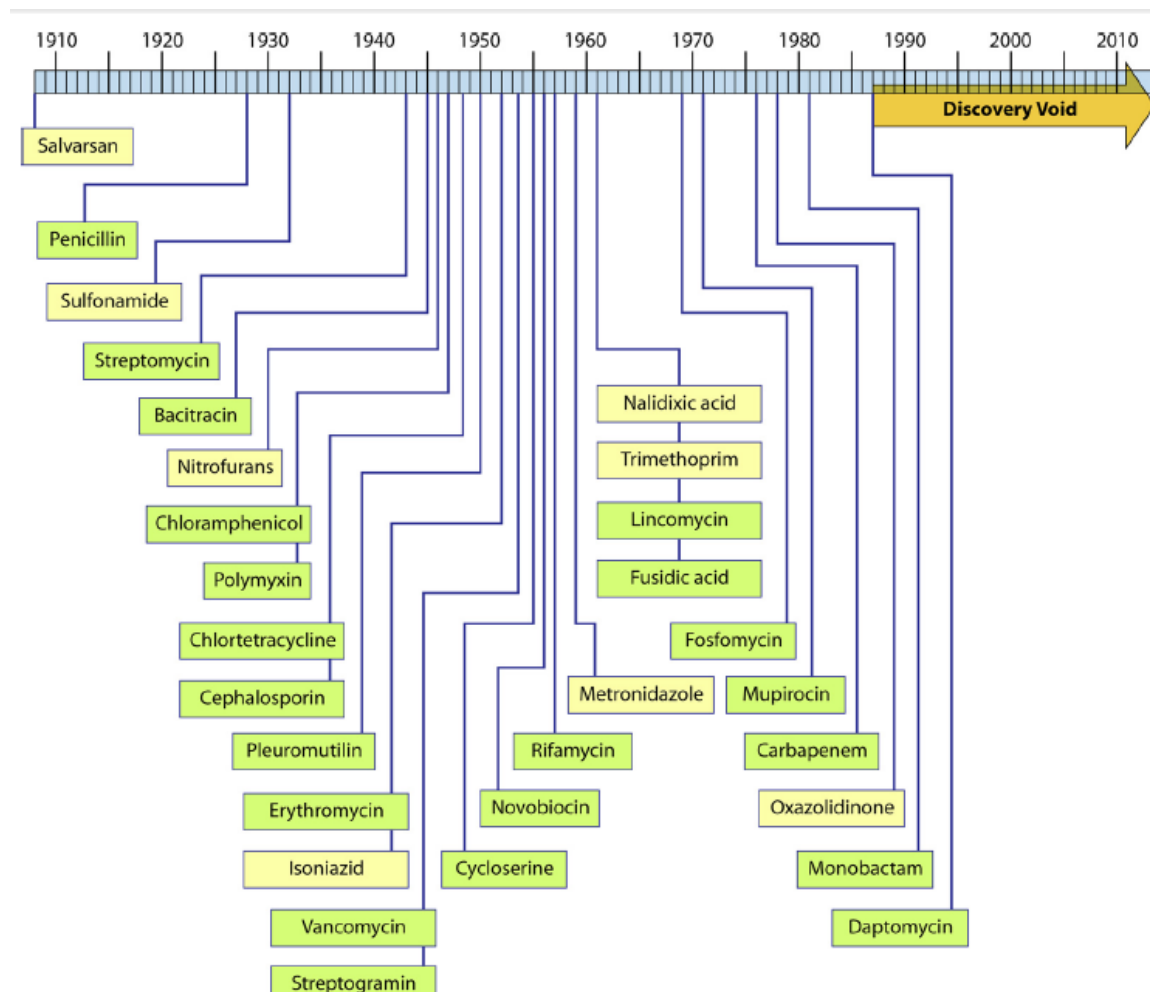


Figure 6 : Illustration montrant l'absence de nouvelles découvertes dans le domaine des antibiotiques ces dernières années. Adapté de (Silver 2011).

Les antibiotiques sont divisés en grandes familles basées sur leurs cibles et leurs mécanismes d'action. Les cibles visées sont, pour la plupart, reliées à des mécanismes qui sont non présents chez les cellules eucaryotes afin d'éviter des effets secondaires indésirables lors du traitement. Parmi les cibles spécifiques aux bactéries, nous retrouvons

les synthèses de peptidoglycane, protéique, de l'ADN et de l'acide folique. Les prochains paragraphes décriront sommairement les cibles des différentes classes d'antibiotiques, leurs mécanismes d'action ainsi que les mécanismes de résistance développés par les bactéries.

### **Les inhibiteurs de la paroi cellulaire**

Plusieurs classes d'antibiotiques peuvent nuire à la synthèse de la paroi cellulaire. Parmi eux, nous retrouvons, les  $\beta$ -lactamines et les glycopeptides.

Les  $\beta$ -lactamines, regroupent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. L'activité des  $\beta$ -lactamines est principalement bactéricide. L'ensemble des molécules agit sur la paroi cellulaire en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines responsables de la transpeptidation. Pour contrer cette action, les bactéries modifient la cible des  $\beta$ -lactamines à l'aide d'enzyme qui dégradent les  $\beta$ -lactamines à l'aide de  $\beta$ -lactamases, et expulsent celles-ci hors de la cellule grâce à des pompes à efflux et diminue également l'expression de certaines porines (Salyers and Whitt 2002, Zhanel *et al.* 2014).

Dans la classe des glycopeptides, on retrouve la vancomycine et la teichoplanine. Les glycopeptides pour leurs parts, se lient au lien D-Ala-D-Ala de la portion de l'UDP-muramyl-pentapeptide, un précurseur du peptidoglycane, empêchant ainsi sa transglycosylation et sa transpeptidation qui sont les deux dernières étapes de la synthèse du peptidoglycane. Cette classe d'antibiotiques est bactéricide. Cependant, comme pour les  $\beta$ -lactamines, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance par la modification de la cible (Ge *et al.* 1999, Salyers and Whitt 2002).

D'autres antibiotiques interviennent dans les premières étapes de la synthèse du peptidoglycane, comme la phosphomycine et la bacitracine. La phosphomycine inhibe la conversion de l'UDP-NAG en UDP-NAM tandis que la bacitracine inhibe la déphosphorylation du bactoprenol empêchant ainsi son utilisation future (Salyers and Whitt 2002).

### **Les inhibiteurs de la synthèse protéique**

Les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides et les streptogramines possèdent toutes l'action d'inhiber la synthèse protéique. Les aminoglycosides seront discutés davantage dans les prochaines pages.

Les tétracyclines sont une classe d'antibiotiques qui comprend entre autres la chlortétracycline et l'oxytétracycline. Elles se lient au ribosome et plus spécifiquement à la partie 30S de celui-ci. Cette liaison entraîne la perturbation du site A ce qui prévient l'alignement de l'ARN de transfert (ARNt) avec le codon de l'ARN messager (ARNm), ce qui a pour effet d'arrêter la synthèse protéique. Cet effet est bactériostatique. Les tétracyclines sont très peu toxiques en comparaison avec d'autres antibiotiques. Dues à des utilisations abusives et prolongée en médecine vétérinaire et en médecine humaine, les bactéries ont développé une grande variété de mécanismes de résistance. Parmi les mécanismes de résistance identifiés, les pompes à efflux, les modifications enzymatiques du ribosome, la dégradation de l'antibiotique et les mutations dans l'ARN ribosomal ont été étudiées (Salyers and Whitt 2002, Nguyen *et al.* 2014).

Les macrolides (ex : érythromycine) inhibent la synthèse protéique en se liant au ribosome, mais contrairement aux tétracyclines, ils se lient à la sous-unité 50S. Cette liaison provoque

un réarrangement de conformation de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S empêchant ainsi la translocation. Tout comme pour les tétracyclines, cet effet est bactériostatique. Les mécanismes de résistance que les bactéries ont développés comportent des pompes à efflux ainsi que des modifications par méthylation de la cible.

Les lincosamides (lincomycine et clindamycine) malgré qu'elles possèdent une structure différente des macrolides, elles partagent le même mécanisme d'action. En effet, elles inhibent la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 50S du ribosome créant ainsi un réarrangement dans l'ARNr 23S ce qui empêche la translocation. Étant donné qu'il s'agit du même mécanisme d'action, les mécanismes de résistance associés sont sensiblement les mêmes.

Les streptogramines (ex : dalfopristine et quinupristine) inhibent la synthèse protéique en utilisant le même mécanisme que les macrolides et les lincosamides. Les mécanismes de résistance sont aussi sensiblement les mêmes puisqu'il a été démontré de la résistance croisée pour ces trois classes d'antibiotiques (Vannuffel and Cocito 1996, Salyers and Whitt 2002).

### **Les inhibiteurs de la réplication de l'ADN**

Les quinolones (ex : l'acide nalidixique) ainsi que les fluoroquinolones (ex : norfloxacin) possèdent le même mécanisme d'action. Cette classe d'antibiotiques lie et inhibe l'ADN gyrase. Cet effet est bactéricide. Normalement, après la réplication de l'ADN, celle-ci doit ensuite prendre la conformation de superhélice par l'activité de l'ADN gyrase. Cependant, une simple mutation dans l'ADN gyrase confère la résistance aux quinolones (Salyers and Whitt 2002).

Une autre classe qui inhibe la réplication de l'ADN est le métronidazole. Celui-ci doit tout d'abord subir une réduction de son groupement nitrite ( $\text{NO}_2$ ) afin d'être activé. Une fois activé, le métronidazole se lie sur l'ADN et brise les brins d'ADN. Cet effet est bactéricide. La résistance au métronidazole se fait principalement par la réduction de la production de l'enzyme nécessaire à son activation (Salyers and Whitt 2002).

D'autres cibles peuvent être également utilisées par d'autres classes d'antibiotiques. Comme l'inhibition de la synthèse de l'ARN par la rifampicine. Une autre cible qui peut être affecté est la voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique, qui est un cofacteur essentiel pour la synthèse des acides nucléiques. Le triméthoprim et les sulfamides sont des inhibiteurs de cette voie. Les sulfamides ont une structure semblable à l'acide aminobenzoïque, précurseur de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, et compétitionnent avec ce dernier afin d'inhiber cette cascade. Le triméthoprim, pour sa part, inhibe la dihydrofolate réductase, la dernière étape de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (Salyers and Whitt 2002).

### **Mécanismes généraux d'antibiorésistance**

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être regroupés en cinq grands groupes basés sur leur mécanisme d'action : en limitant l'entrée d'antibiotique dans la cellule; en expulsant l'antibiotique hors de la cellule; par l'inactivation enzymatique de l'antibiotique; par modification de la cible et en empêchant l'activation de l'antibiotique (Salyers and Whitt 2002).

La résistance par limitation de l'entrée d'antibiotique a lieu, la plupart du temps en modifiant la perméabilité de la cellule. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe peut agir comme barrière empêchant l'antibiotique de rejoindre sa cible. Par

exemple, la vancomycine est très efficace chez les bactéries à Gram positif, cependant elle n'est pas efficace contre les bactéries à Gram négatif, car elle n'est pas capable de franchir la membrane externe.

On retrouve la résistance par expulsion de l'antibiotique hors de la cellule chez plusieurs classes d'antibiotiques. Des protéines appelées «pompes à efflux» se chargent de sortir l'antibiotique hors de la cellule afin que les concentrations intracellulaires soient faibles. Chez les tétracyclines, ce type de résistance a été retrouvé chez les bactéries à Gram négatif (gènes *tetA* à *tetG*) et chez les bactéries à Gram positif (gènes *tetK* et *tetL*). Les macrolides, les quinolones ainsi que les streptogramines utilisent également un système de pompe à efflux.

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique est un mécanisme très important, surtout chez les bactéries à Gram négatif. Pour contrer les  $\beta$ -lactamines, les bactéries ont développé des enzymes qui les inhibent, les  $\beta$ -lactamases. Ces enzymes sont excrétées dans l'espace périplasmique. Cependant, les  $\beta$ -lactamases sont spécifiques à chaque  $\beta$ -lactamines. Il existe une molécule, l'acide clavulanique, qui est un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase. D'autres classes d'antibiotiques comme les aminoglycosides ont recourt à des enzymes modifiant l'antibiotique. Dans ce cas, il s'agit d'acétyltransférase, de phosphotransférase et d'adényltransférase qui inhibent les aminoglycosides en ajoutant un groupement acétyle, phosphate ou adényle respectivement. Certaines acétyltransférases sont également capables de modifier les streptogramines (gènes *vat* et *sat*) et les tétracyclines (gènes *tetX* et *tet37*) (Salyers and Whitt 2002, Nguyen *et al.* 2014).

La modification de la cible est un moyen important de contrer les antibiotiques. Pour la classe des  $\beta$ -lactamines. Le meilleur exemple est le gène *mecA* retrouvé chez

*Staphylococcus aureus*. Ce gène code pour une protéine liant la pénicilline (penicillin-binding protein) qui n'est pas inhibée par la méthicilline. Un autre exemple serait pour la vancomycine, des gènes (*vanA* et *vanB*) codant pour des ligases qui modifient le D-Ala-D-Ala par un D-Ala-D-lactate. Pour les tétracyclines, on retrouve les gènes *tetM*, *tetO*, *tetQ* qui modifient et protègent le ribosome. Pour les macrolides, les streptogramines et les lincosamides, un enzyme (ARNr méthylase) modifie l'ARNr empêchant ainsi son interaction avec l'antibiotique.

Le dernier mécanisme est par l'empêchement de l'activation de l'antibiotique. Le meilleur exemple de ce mécanisme est le métronidazole. Des mutations réduisant l'expression de la protéine (flavodoxine) responsable de l'activation du métronidazole provoque une résistance à celle-ci (Salyers and Whitt 2002).

## **Néomycine**

### **Généralités**

La néomycine est un antibiotique bactéricide de la famille des aminoglycosides également appelée aminosides. Les aminoglycosides sont des antibiotiques synthétisés naturellement par la bactérie *Streptomyces spp.*, tels la kanamycine, la streptomycine, la spectinomycine, la tobramycine et la néomycine. La gentamicine et la sisomycine font également partie de la famille des aminoglycosides, mais sont synthétisées par *Micromonas spp.* Dans les années 1970, sont apparus les aminoglycosides semi-synthétiques comme l'amikacine dérivée de la kanamycine et la netilmicine et l'isepamycine toutes deux dérivées de la gentamicine (Davies and Wright 1997, Poulikakos and Falagas 2013). Les aminoglycosides ont un effet bactéricide à large spectre d'action, ils sont efficaces contre les bactéries à



Gram positif, à Gram négatif et les mycobactéries à l'exception de *Neisseria gonorrhoea*, *Brucella abortus*, *Stenotrophomonas maltophilia* et les coques à Gram positif. Les aminoglycosides sont largement utilisées en médecine humaine malgré leur effet néphrotoxique (Poulikakos and Falagas 2013). Pour sa part, la néomycine peut également avoir un effet ototoxique (toxicité de l'oreille interne ou du nerf auditif) en engendrant l'apoptose des cellules de l'oreille par l'activation d'une caspase (Rybak and Ramkumar 2007). La néomycine est utilisée en administration topique pour traiter les infections aux yeux et aux oreilles. Elle peut également être donnée en prophylaxie par voie orale lors d'une intervention chirurgicale de l'intestin (Poulikakos and Falagas 2013).

### **La néomycine en usage vétérinaire**

Dans le compendium canadien des produits vétérinaires, on retrouve 18 produits différents homologués pour le porc contenant la néomycine ou la néomycine sulfate seule ou en combinaison avec d'autres produits actifs. Les produits contenant la néomycine seule sont des produits sous forme de poudre que l'on mélange à l'eau de boisson. Ce type de médicament permet de traiter rapidement l'ensemble d'un troupeau lorsqu'apparaissent les signes de la maladie (Compendiums 2015).

Tel que mentionné précédemment, l'utilisation d'antibiotiques entraîne une augmentation de la résistance à cet antibiotique chez certains microorganismes. Le taux de résistance à la néomycine est très variable dans le temps, selon les pays et selon les espèces bactériennes chez lesquelles on retrouve cette résistance. Une étude faite par Maynard et al. en 2003 nous montre l'évolution de l'antibiorésistance à la néomycine chez des ETEC O:149 sur une période de 23 ans au Québec. Dans cette étude, on note un pourcentage de résistance de

40 % entre les années 1978-1984 suivi par une diminution à 21 % de 1985-1989 jusqu'à un minimum à 18 % entre 1990-1994 puis une augmentation à 49 % entre 1995-2000 avec un taux de résistance moyen de 35 % (Maynard *et al.* 2003). Les auteurs ne font malheureusement pas de lien entre l'utilisation de la néomycine et l'augmentation de la résistance dans la dernière période de cette étude. Ils décrivent cependant une absence de variation dans la présence des gènes de résistance *aph(3')-Ia* et *aph(3')-IIa* durant l'ensemble de l'étude ce qui semble dépendre l'endroit géographique, puisqu'une étude danoise a démontré une variation des gènes de résistance à la néomycine dans le temps (Sandvang and Aarestrup 2000). En 2008, Akwar *et al.* ont publié un modèle évaluant la résistance au Canada, plus précisément en Ontario et en Colombie-Britannique, et ont évalué un taux de résistance de 10 % pour la néomycine (Akwar *et al.* 2008). Chez nos voisins américains, une étude effectuée sur une période de 10 ans, entre les années 1995 et 2004 au Minnesota par Malik *et al.* a montré un taux de résistance à la néomycine moyen de 52 % avec un minimum de 46 % en 1997 et un maximum de 66 % en 2004 (Malik *et al.* 2011). Si l'on regarde la situation dans d'autres pays, une étude effectuée sur une période de 10 ans (2002-2011) chez les *E. coli* F4+ en Italie, a démontré un taux moyen de 72 % de résistance aux aminoglycosides, famille d'antibiotiques pour dont la néomycine fait partie (Luppi *et al.* 2015). Une autre étude effectuée par Smith *et al.* sur 6 ans (1999-2005) en Australie chez des *E. coli* ayant causé la diarrhée post-sevrage montre un taux de résistance de 37 % (Smith *et al.* 2010). Si l'on regarde maintenant dans d'autres pays et chez d'autres pathotypes d'*E. coli*, lors d'une autre étude effectuée en Chine sur des *E. coli* extra-intestinaux retrouvés chez le porc sur une période de 4 ans (2004-2007), Tang *et al.* ont rapporté un taux de résistance de 87 % à la néomycine (Tang *et al.* 2011). Une autre étude

effectuée en Chine sur les *E. coli* causant des maladies chez le poulet à griller (APEC) (Li et al. 2015) a rapporté un taux de résistance de 53 % à la néomycine (Li et al. 2015). À la lumière de ces études, on peut conclure que le taux de résistance à la néomycine est très variable (de 10 % à 87 %) en fonction des pays, des années, du type d'échantillons analysés et de différents pathotypes d'*E. coli* ainsi que de l'espèce animale étudiée.

Selon la base de données APZEC (EcL 2013), il est possible de voir l'évolution de la résistance à la néomycine des dernières années. Comme le montre la Figure 7, on remarque une légère diminution du taux de résistance à la néomycine de 2010 à 2013 au Canada chez les ETECs causant de la diarrhée chez le porc de 22 à 89 jours. Entre 2010 et 2013, on peut noter que le taux moyen est de 28 %. Cette donnée est en accord avec les constatations des vétérinaires-praticiens du Québec qui prétendent que 1 traitement sur 4 voire 1 traitement sur 3 à la néomycine ne fonctionne pas (Figure 7).

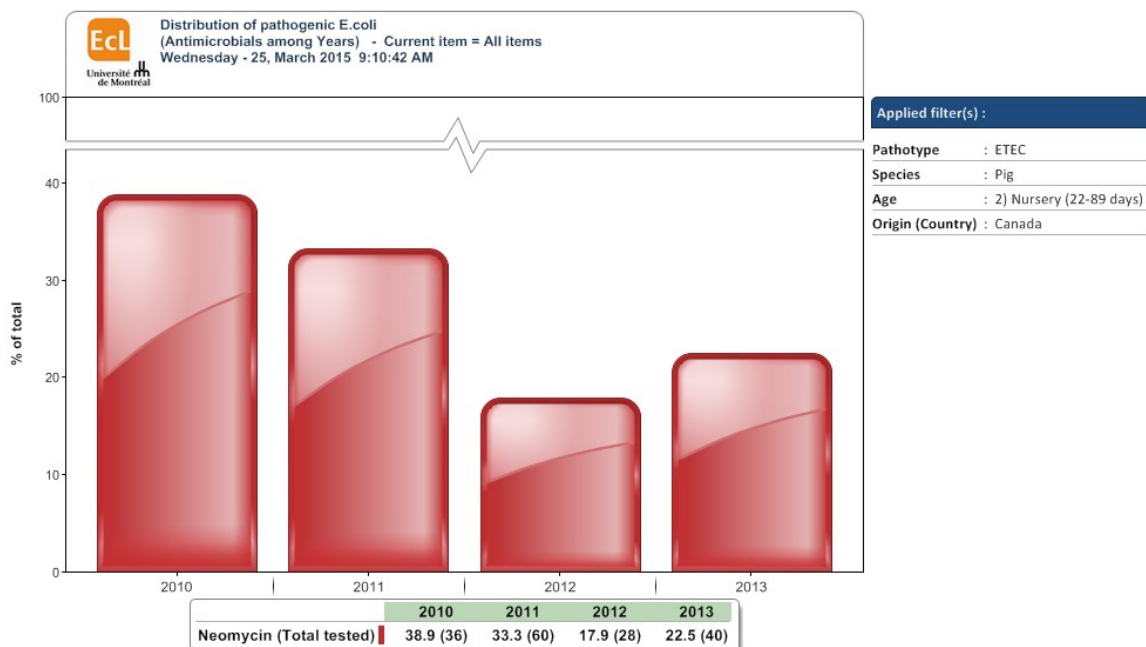


Figure 7 : Pourcentage de résistance à la néomycine chez des ETECs causant de la diarrhée chez le porc âgé de 22 à 89 jours (EcL 2013).

## Synthèse protéique

Le mécanisme d'action de la néomycine est caractérisé par sa liaison au ribosome bactérien et produisant ainsi des protéines non fonctionnelles. Pour comprendre plus en détail ce mécanisme d'action, il faut tout d'abord comprendre la traduction protéique bactérienne (Figure 8). Le ribosome bactérien est composé de 2 sous-unités soit la petite (30S) et la grande (50S). La sous-unité 30S est constituée de l'ARN 16S et de 20 protéines. La sous-unité 50S est pour sa part constituée de l'ARN 23S et 5S et de 34 protéines. Ces 2 sous-unités constituent le ribosome bactérien qui est au cœur de la traduction protéique. Cette traduction se déroule en 3 grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Tout d'abord, il y a le rassemblement des 2 sous-unités pour former le ribosome entier. Des

facteurs d'initiation de la traduction viennent assister la liaison de l'ARN messager (ARNm) à la sous-unité 30S et provoquent la liaison de l'ARN de transfert couplé à une méthionine au site P du complexe. Une fois la traduction bien initiée, l'allongement de la chaîne peptidique peut débuter. Le prochain acide aminé couplé à l'ARN de transfert (ARNt) vient s'insérer dans le site A. Afin de s'assurer de l'exactitude de la traduction, l'anticodon de l'ARNt doit bien compléter le codon de l'ARNm. La sous-unité 50S, et plus précisément le centre peptidyl-transférase, catalyse un lien peptidique entre les deux acides aminés, allongeant ainsi la future protéine. Une fois le lien peptidique créé, l'ARNt non couplé à l'acide aminé se déplace dans le site d'exclusion E tandis que l'ARNt couplé à la chaîne peptidique est transféré au site P laissant ainsi libre le site A pour un nouvel ARNt. Ce phénomène est appelé la translocation. Lorsque le nouvel ARNt arrive au site A, il y a relâchement de l'ARNt par le site E. Ce processus se poursuit jusqu'à l'arrivée du codon d'arrêt (codon-STOP) sur l'ARNm. L'ARNt est couplé à un facteur de relâchement qui, lorsque lié au site A, provoquera une hydrolyse du lien peptidique relarguant ainsi la chaîne peptidique. Il y aura par la suite dissociation des 2 sous-unités du ribosome (McCoy *et al.* 2011).

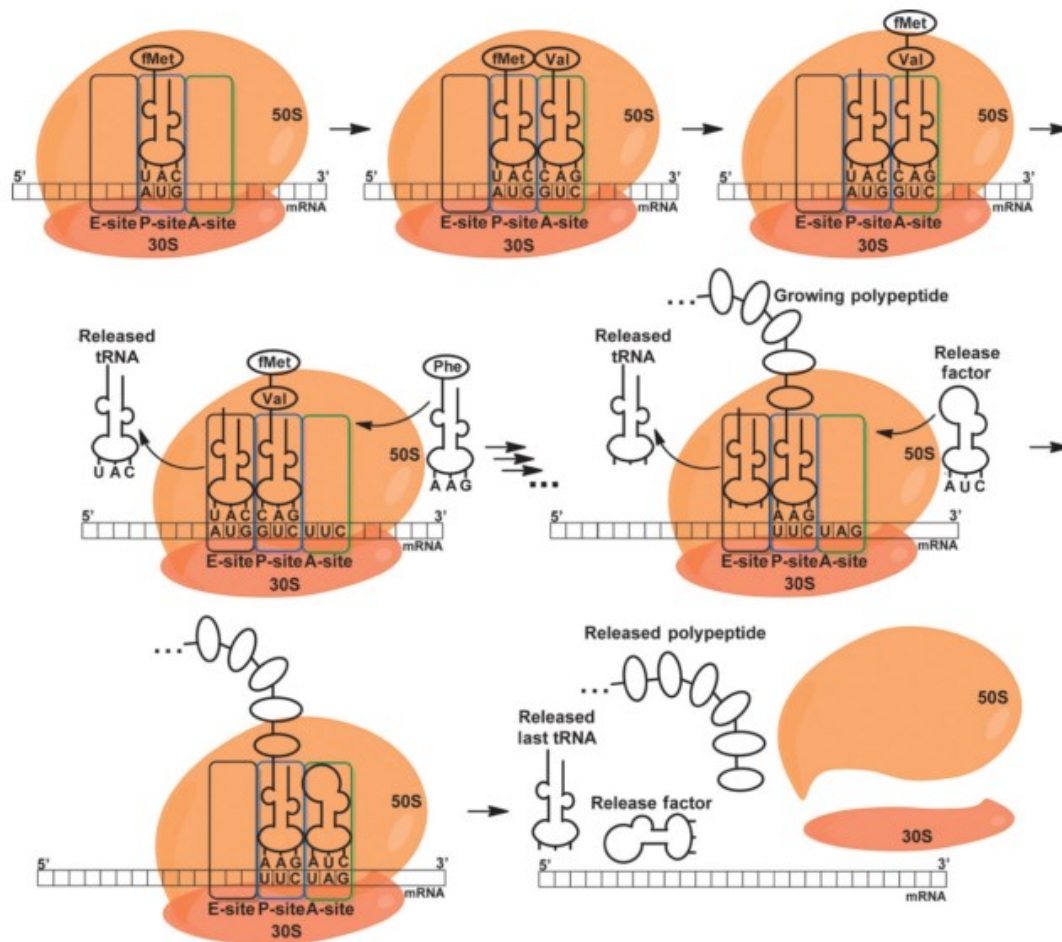


Figure 8 : Les principales étapes de la traduction chez les procaryotes. Adapté de (McCoy *et al.* 2011).

### Néomycine mécanisme d'action

Plusieurs molécules peuvent venir perturber le processus de synthèse protéique en se liant à trois sites particuliers : le site A du 30S, le centre peptidyl-transférase et le tunnel de sortie (site E) du 50S. Les molécules telles que le chloramphénicol, la clindamycine, la tiamuline, la sparsomycine et les streptogramines vont lier le centre peptidyl-transférase et empêcher la

formation du lien peptidique. Les macrolides lient le tunnel de sortie du peptide empêchant ou retardant la synthèse du nouveau peptide (McCoy *et al.* 2011).

Dans le cas des aminoglycosides comme la néomycine, celle-ci se lie au site A, plus précisément à l'ARN 16S de la sous-unité 30S du ribosome (Poulikakos and Falagas 2013). Cette liaison provoque un changement de conformation des résidus alanine en position 1492 et 1493 et du résidu glycine en position 530. Cette nouvelle conformation perturbe le processus de décodage du site A provoquant une perte d'affinité entre le codon et l'anticodon entraînant une mauvaise insertion d'acide aminé et la production d'une protéine aberrante (McCoy *et al.* 2011). En plus de provoquer des erreurs dans la traduction, il est rapporté que la néomycine inhibe également la translocation des ARNt (Mehta and Champney 2003, Ramirez and Tolmasky 2010). Chez les bactéries à Gram négatif, l'internalisation de néomycine se fait par un processus énergie-dépendant qui se fait en trois phases : tout d'abord, lorsque la néomycine entre en contact avec la bactérie, elle se lie à des structures de surface comme les lipopolysaccharides (LPS), des phospholipides et autres protéines de la membrane. Ces différentes liaisons provoquent un réarrangement des protéines de surface et augmentent ainsi la perméabilité de la cellule, ce qui provoque un phénomène appelé l'absorption auto-induite (self-promoted uptake). Une petite quantité de néomycine est alors transportée dans le cytoplasme par un système énergie dépendant lié à la respiration, par des protéines de la chaîne de transporteurs d'électrons. Dans un second temps, l'accumulation de la protéine défectueuse dans la membrane augmente ainsi la perméabilité de celle-ci qui induit un apport plus important de néomycine dans la cellule. Finalement, l'accumulation de protéine défectueuse provoquera la mort de la cellule (Ramirez and Tolmasky 2010, Poulikakos and Falagas 2013).

## Néomycine mécanisme de résistance

Les bactéries ont développé plusieurs mécanismes afin d'échapper à ce type de molécule. La résistance aux aminoglycosides et par le fait même à la néomycine peut se faire par plusieurs mécanismes : la modification de la cible par des mutations de l'ARN16S ou de protéine associée; la méthylation de l'ARN 16S, mécanisme retrouvé chez les organismes qui produisent des aminoglycosides; une réduction de la perméabilité cellulaire; une exportation des molécules à l'extérieur de la cellule par des pompes à efflux; la séquestration de la molécule grâce à des acétyltransférases de faible activité et le mécanisme le plus fréquent, soit une modification enzymatique de l'antibiotique. On retrouve trois types de modifications possibles chez les aminoglycosides : l'acétylation par des acétyltransférases; la nucléotidylation par des nucléotidyltransférases et des phosphorylations par des phosphotransférases. Dans le cas spécifique de la néomycine, les modifications entraînant la résistance sont la phosphorylation et l'acétylation (Davies and Wright 1997, Ramirez and Tolmasky 2010, Poulikakos and Falagas 2013).

L'acétylation se fait par des enzymes appelés N-acétyltransférase qui regroupent plusieurs protéines. Ces enzymes catalysent une réaction d'acétylation du groupement  $\text{NH}_2$  en utilisant la coenzyme A acétylée. L'acétylation peut se faire sur la position 1, 2, 3, 6. Dans le cas de la néomycine, les positions 1 AAC(1) et 3 AAC(3) sont fréquemment retrouvées (Figure 9). Les enzymes de la classe des AAC(1) sont retrouvés sur le chromosome de *E. coli* et *Campylobacter spp.* La classe des AAC(3) est beaucoup plus nombreuse et provient d'une plus grande variété de genres bactériens. Pour la néomycine, l'enzyme AAC(3)-Iva, porté sur le gène *aac(3)-IVa*, est le plus souvent incriminé pour la modification



de la néomycine. Chez *E. coli*, ce gène est souvent retrouvé sur un plasmide (Davies and Wright 1997, Ramirez and Tolmasky 2010) et est donc transférable.

La phosphorylation se fait par des phosphotransférases. La phosphorylation se fait en position 4, 6, 9, 3', 2'', 3'' et 7''. Dans le cas spécifique de la néomycine, seulement la position 3' est modifiée et la classe d'enzyme est la APH(3'). Les APH(3') sont divisés en quatre sous-classes : APH(3')-I, APH(3')-II, APH(3')-III et APH(3')-IV. La néomycine est phosphorylée par l'ensemble de ces sous-classes, cependant les sous-classes APH(3')-III et APH(3')-IV sont principalement retrouvées chez des bactéries à Gram positif. Les gènes codant pour la sous-classe APH(3')-I sont retrouvés chez plusieurs bactéries à Gram négatif et se trouvent sur des éléments mobiles comme des plasmides et des transposons. Par exemple, le gène *aph(3')-Ia* est retrouvé sur le transposon Tn903; le gène *aph(3')-Ib* est retrouvé sur le plasmide conjugatif RP4. Les gènes codant pour la sous-classe APH(3')-II sont retrouvés à la fois sur des transposons (le gène *aph(3')-Iia* retrouvé sur le Tn5) et sur le chromosome (le gène *aph(3')-IIb* retrouvé sur le chromosome de *P. aeruginosa* (Davies and Wright 1997, Ramirez and Tolmasky 2010)).

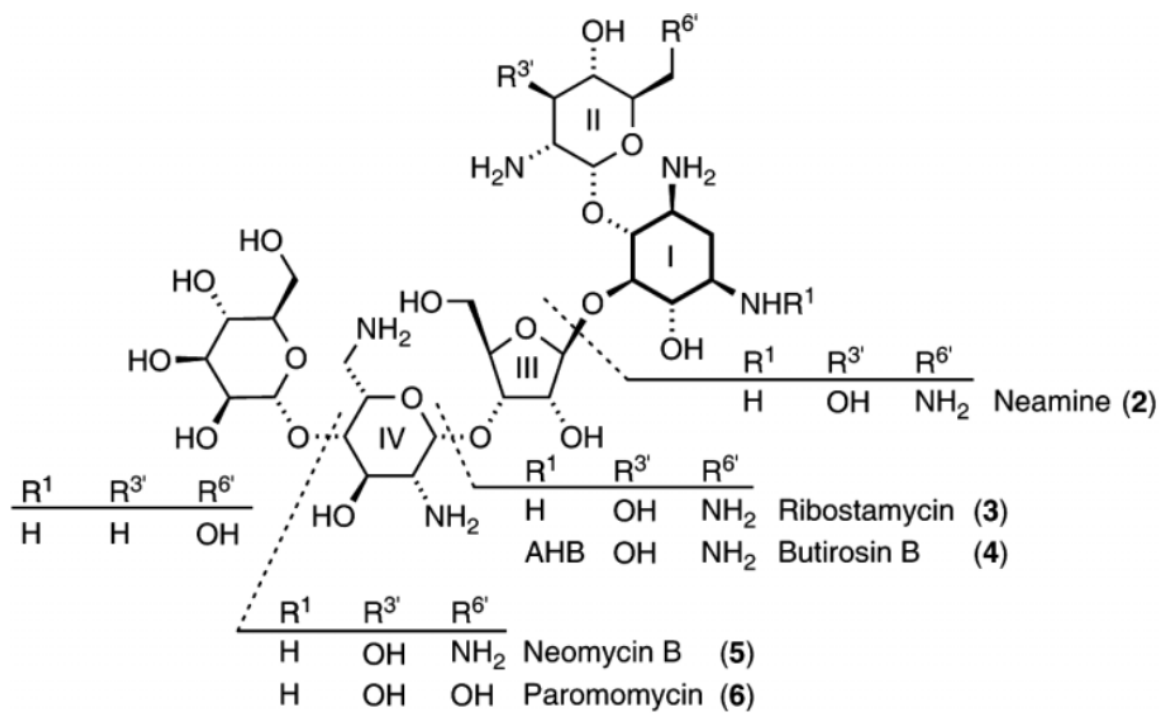


Figure 9 : Représentation de la néomycine et autres aminoglycosides. Ils partagent une structure semblable. Adapté de (McCoy *et al.* 2011).

## **Pratique vétérinaire au Québec**

Le vétérinaire est responsable de diagnostiquer des problèmes de santé chez les animaux. Il doit être en mesure d'établir des plans de prévention des maladies (traitement prophylaxie) et des marches à suivre pour traiter les infections existantes (traitement curatif). Lors de l'établissement de protocoles prophylactique ou curatif, le vétérinaire doit tenir compte de plusieurs paramètres :

- Signes cliniques et diagnostic;
- L'état d'avancement de la science ou de normes consensuelles;
- L'efficacité des traitements;
- Le bien-être des animaux traités;
- La salubrité et l'innocuité des produits destinés à la consommation;
- L'utilisation judicieuse et le respect des normes légales et réglementaires dans l'utilisation des médicaments et des vaccins.

L'utilisation des antibiotiques en usage vétérinaire est un outil essentiel afin de contrôler les problèmes de santé. Toutefois cet usage par les vétérinaires des grands animaux ou animaux de production doit se faire de manière judicieuse et responsable. Cette utilisation peut se faire à plusieurs fins :

- Usage curatif : traiter une infection bactérienne;
- Usage métaphylactique : traiter l'ensemble d'un troupeau lorsqu'un certain nombre d'entre eux manifestent des signes d'infection;
- Usage préventif : traiter un troupeau sain, mais dont l'historique indique un risque élevé de développer une infection;

- Usage comme facteur de croissance : donné à l'ensemble du troupeau dans le but de moduler la flore afin d'éviter un déséquilibre dans celle-ci.

La province du Québec et de Terre-Neuve sont les deux seules provinces canadiennes où les médicaments vétérinaires sont vendus sous prescription. Ce qui implique que dans les autres provinces, l'achat et la distribution de médicament peuvent être faits par le producteur.

### **Utilisation hors étiquette ou hors homologation**

Les médicaments vétérinaires utilisés sont approuvés par Santé Canada et doivent être homologués. Chaque médicament doit être homologué pour des indications précises et avoir un mode d'emploi bien défini qui comprend les paramètres suivants :

- Espèces animales;
- Maladie/infection bactérienne;
- Voie d'administration (intramusculaire, intraveineux, oral dans l'aliment, orale dans l'eau de boisson, topique, etc.);
- Dosage;
- Durée du traitement;
- Période de retrait (période suivant la dernière administration durant laquelle l'animal ne doit pas être abattu pour la consommation)

Cependant, ces antibiotiques ont été homologués il y a longtemps et les allégations d'étiquettes ne conviennent plus toujours pour le traitement efficace des maladies actuelles. Étant donné l'apparition de résistance aux antibiotiques, les dosages homologués deviennent donc insuffisants pour traiter les infections. De plus, l'apparition de variants, de nouveaux sérotypes, de bactéries ayant acquis des facteurs de virulence ou de maladie rare

ou orpheline forcent les vétérinaires à utiliser des antibiotiques pour d'autres espèces animales que celles pour lesquelles ces antibiotiques ont été initialement homologués.

D'autres usages hors homologation des antibiotiques peuvent également être faits :

- L'utilisation d'une préparation magistrale (préparation maison d'un produit homologué ou non)
- L'utilisation d'un antibiotique pas encore homologué ou en voie d'homologation, mais avec l'accord de Santé Canada par un EDR (Emergency Drug Release)

L'utilisation de la pratique hors homologation, lorsque faite par un vétérinaire, devient un outil indispensable pour contrer les infections bactériennes et ainsi faire un usage plus judicieux des antibiotiques. Les pratiques hors homologation sont un droit que les médecins vétérinaires possèdent et doivent être faites en accord avec des données scientifiques disponibles dans la littérature scientifique et dans d'autres pays, et approuvées par le Canadian Global Food Animal Residue Avoidance Databank (CgFARAD) afin d'éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans la viande des consommateurs. Toutefois, il demeure des incertitudes scientifiques quant à ces usages lorsque les doses sont augmentées sans modification de la période de retrait et ce qui peut avoir un impact sur la salubrité de la viande par la présence potentielle de résidus.

## Colistine

### Historique

La colistine est un antibiotique de la famille des polymyxines. Cette famille d'antibiotiques compte 5 membres soit les polymyxines A à E (Falagas and Kasiakou 2005). Cependant, seulement les polymyxines B et E sont utilisées en médecine humaine et/ou vétérinaire. Cette famille d'antibiotiques fut découverte vers la fin des années 1940 plus précisément en 1947 avec la polymyxine B qui est produite par *Bacillus polymyxa* (Benedict and Langlykke 1947, Falagas and Kasiakou 2005, Kwa *et al.* 2008). Cette dernière est souvent retrouvée en médecine humaine dans les onguents antibiotiques à usage topique ou dans les gouttes pour les yeux, par exemple les produits Polysporin™. La polymyxine E aussi appelée colistine est synthétisée par la bactérie *Bacillus polymyxa subsp. colistinus* découverte en 1949. La colistine fut d'abord utilisée au Japon et en Europe dans les années 1950 et aux États-Unis en 1959 sous la forme de colistiméthate sodique. À la fin des années 1960 et début des années 1970, plusieurs études ont démontré une toxicité et plus spécifiquement une néphrotoxicité de la colistine et du colistiméthate sodique (Ryan *et al.* 1969, Brown *et al.* 1970, Koch-Weser *et al.* 1970, Falagas and Kasiakou 2005). Dès le début des années 1980, la colistine était retirée de l'usage en médecine humaine, et ce, à travers le monde. Cependant, avec l'augmentation des bactéries à Gram négatif multi-résistantes et pour traiter les infections des poumons des patients atteints de fibrose kystique, la colistine devient un antibiotique de dernier recours contre ces infections (Falagas *et al.* 2010) et Santé Canada a donc classé cet antibiotique dans la catégorie de très haute importance en santé humaine.

## Utilisation en médecine vétérinaire

L'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire est une pratique répandue chez plusieurs espèces pour le traitement des infections causées par *E. coli* telles que des diarrhées, des colibacilloses et des septicémies. Chez le porc, l'utilisation de la colistine est principalement pour traiter la diarrhée pendant et après le sevrage chez le porcelet (Kempf *et al.* 2013). L'utilisation de la colistine dans l'élevage porcin, est retrouvée chez de grands pays producteurs tels que le Brésil, le Japon ainsi que chez plusieurs pays de l'Union européenne (France, Belgique, Danemark, etc.). Par exemple, en France, nous retrouvons 24 produits différents contenant la colistine comme ingrédient actif, dont 3 produits en combinaison avec un autre antibiotique d'une autre famille. Au Brésil il s'agit de 3 produits contenant la colistine et tous en combinaison avec un autre antibiotique. Pour le Danemark, on retrouve 4 produits différents contenant seulement la colistine comme ingrédient actif. Une étude faite en France sur l'utilisation des antibiotiques dans le secteur animal montre que le tiers de l'exposition des porcs aux antibiotiques est associé à la colistine. Il est également rapporté dans ce pays que sur les 83 fermes de l'étude, 90 % utilisent la colistine en pouponnière, 48 % en maternité et 19 % en engraissement (Chauvin 2010, Kempf *et al.* 2013). En Belgique, la colistine est l'antibiotique administré par voie orale le plus utilisé pour traiter la diarrhée et la maladie de l'oedème chez le porc (Callens *et al.* 2012, Kempf *et al.* 2013). Dans les dernières années, chez les pays de l'Union européenne, particulièrement en Espagne et au Danemark, la colistine est en hausse d'utilisation. De plus, selon le deuxième rapport de l'ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) qui recense les ventes d'antibiotiques dans 19 pays de l'Union européenne, la famille des polymyxines, incluant la colistine, représentait 7 % des ventes d'antibiotiques en

solution orale. Dans ce même rapport, l'Espagne est le plus grand acheteur de colistine (Anonyme 2012, Kempf *et al.* 2013).

La dose habituellement utilisée chez le porc dans l'Union européenne est d'environ 100 000 UI/kg. Cependant, dans certains pays ne faisant pas partie de l'Union européenne, les praticiens utilisent des doses inférieures à 100 000 UI/kg avec des allégations de facteur de croissance (Katsunuma *et al.* 2007). Au Canada et aux États-Unis, la colistine n'est pas homologuée chez l'espèce porcine.

Au Canada, les antibiotiques sont classés en quatre grands groupes de 1 à 4 selon leur importance en santé humaine soit de très haute importance à faible importance. Comme le montre le tableau I, les polymyxines, et par le fait même la colistine, se retrouvent dans la catégorie I principalement due à la résistance des bactéries aux antibiotiques utilisés pour traiter les cas de fibrose kystique (Tableau 1) (Anonyme 2014).



Tableau 1 : Classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine.

Adapté de (Anonyme 2014).

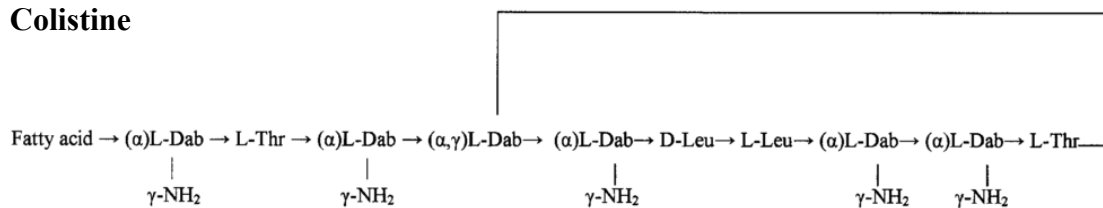
Catégorie d'importance en médecine humaine		Classe d'antimicrobiens
<b>I</b>	<b>Très haute importance</b>	Carbapénems Céphalosporines de 3 <sup>ième</sup> et de 4 <sup>ième</sup> génération Fluoroquinolones Glycopeptides Glycylcyclines Kétolides Lipopeptides Monobactams Nitroimidazoles (métronidazole) Oxazolidinones Associations pénicilline-inhibiteur de $\beta$ -lactamase Polymyxines (colistine) Agents thérapeutiques contre la tuberculose (ex. éthambutol, isoniazide, pyrazinamide et rifampine)
<b>II</b>	<b>Haute importance</b>	Aminoglycosides (sauf les agents topiques) Céphalosporines - Première et deuxième générations (y compris les céphamycines) Acide fusidique Lincosamides Macrolides Pénicillines Quinolones (sauf les fluoroquinolones) Streptogramines Triméthoprim-sulfaméthoxazole
<b>III</b>	<b>Importance moyenne</b>	Aminocyclitols Aminoglycosides (agent topique) Bacitracines Fosfomycine Nitrofuranes Phénicoles Sulfamides Tétracyclines Triméthoprim
<b>IV</b>	<b>Importance faible</b>	Flavophospholipols Ionophores

## Structure

La colistine est un antibiotique peptidique ayant un poids moléculaire d'environ 1750 Da. Elle est constituée d'un décapeptide (10 acides aminés). Ce décapeptide contient trois acides aminés soit la D-leucine, la L-thréonine et l'acide L- $\alpha$ ,  $\gamma$ -diaminobutyrique (DAB). Sur le dernier DAB, on retrouve un lien amine qui le relie à un acide gras (Katz and Demain 1977, Storm *et al.* 1977, Falagas and Kasiakou 2005). Cet acide gras varie en fonction du type de

colistine : un 6-méthyloctanoyl dans le cas de la colistine A ou un 6-méthylheptanoyl dans le cas de la colistine B. La structure des différentes colistines est résumée dans la Figure 10 (Orwa *et al.* 2001). Les formulations de colistine retrouvées en médecine vétérinaire contiennent en proportion variable la colistine A et B (Landman *et al.* 2008). La partie cyclique de la colistine constitue la partie hydrophile tandis que la chaîne d'acide gras est hydrophobe. On remarque également des groupements  $\text{NH}_2$  qui sont liés à l'acide L- $\alpha$ ,  $\gamma$ -diaminobutyrique. Ces groupements portent des charges positives responsables de l'action de la colistine sur la membrane de la bactérie. On retrouve deux formes de colistine. La colistine sulfate, qui se retrouve sous forme orale, soit en comprimé ou en sirop chez l'homme ou en poudre soluble chez le porc et le colistiméthate sodique aussi appelé colistine méthanosulfonate, colistiméthanosulfonate pentasodique et colistine sulfonyl méthate. Cette dernière est moins toxique et doit être administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire. La structure du colistiméthate sodique est très proche de la structure de la colistine, les groupements amines ( $\text{NH}_2$ ) sont liés à des groupements méthyle, sulfonate et sodique. Ces modifications la rendent moins toxique (Figure 10) (Orwa *et al.* 2001, Falagas and Kasiakou 2005, Vaara 2010).

## Colistine



## Colistiméthate sodique

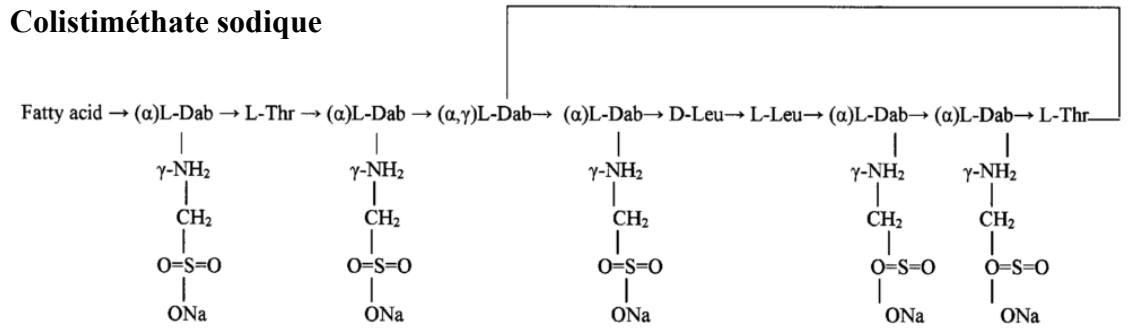


Figure 10 : Structure de la colistine et du colistiméthate sodique. Adapté de (Falagas and Kasiakou 2005)

## Mécanisme d'action « classique »

La membrane des bactéries à Gram négatif est constituée de 2 membranes lipidiques séparées par une couche de peptidoglycane. Comme le montre la Figure 11, la membrane externe diffère de la membrane interne par la présence de lipopolysaccharides (LPS) contrairement à la membrane interne qui se constitue de phospholipides. La colistine, de par ses charges positives (groupement NH<sub>2</sub>), possède une affinité pour la membrane externe des bactéries à Gram négatif et plus précisément pour les lipopolysaccharides (LPS). Le LPS bactérien est une structure présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif. Elle est constituée de trois parties : le lipide A, le noyau polysaccharidique et la répétition de l'antigène O. Le noyau polysaccharidique se divise pour sa part en deux parties, le noyau

interne et le noyau externe (Clausell *et al.* 2007, Wang and Quinn 2010). La membrane externe des bactéries à Gram négatif étant chargée négativement, l'interaction entre la colistine et le LPS provoque la liaison de ces deux structures. La colistine vient se lier au lipide A des LPS, puisque la colistine possède une affinité pour le LPS trois fois supérieure à celle des cations divalents magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et calcium ( $Ca^{2+}$ ) qui sont normalement présents dans la membrane externe et qui assurent ainsi la stabilité de celle-ci. Cette interaction provoquera le déplacement des cations  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  engendrant ainsi une perturbation dans la fonction de barrière de la membrane externe (Hancock 1997). Comme le montre la Figure 12, il y aura par la suite, formation de pores qui permettront aux contenus intracellulaires de s'échapper dans l'espace extracellulaire provoquant ainsi la mort de la bactérie (Falagas and Kasiakou 2005, Yahav *et al.* 2012). Une photo en microscopie électronique à transmission de *P. aeruginosa*, Figure 13, nous montre également la création de pores ainsi que la projection du matériel cellulaire à l'extérieur de la cellule qui semble provenir de la membrane externe de la cellule indiquant la perte de l'intégrité de celle-ci (Koike *et al.* 1969).

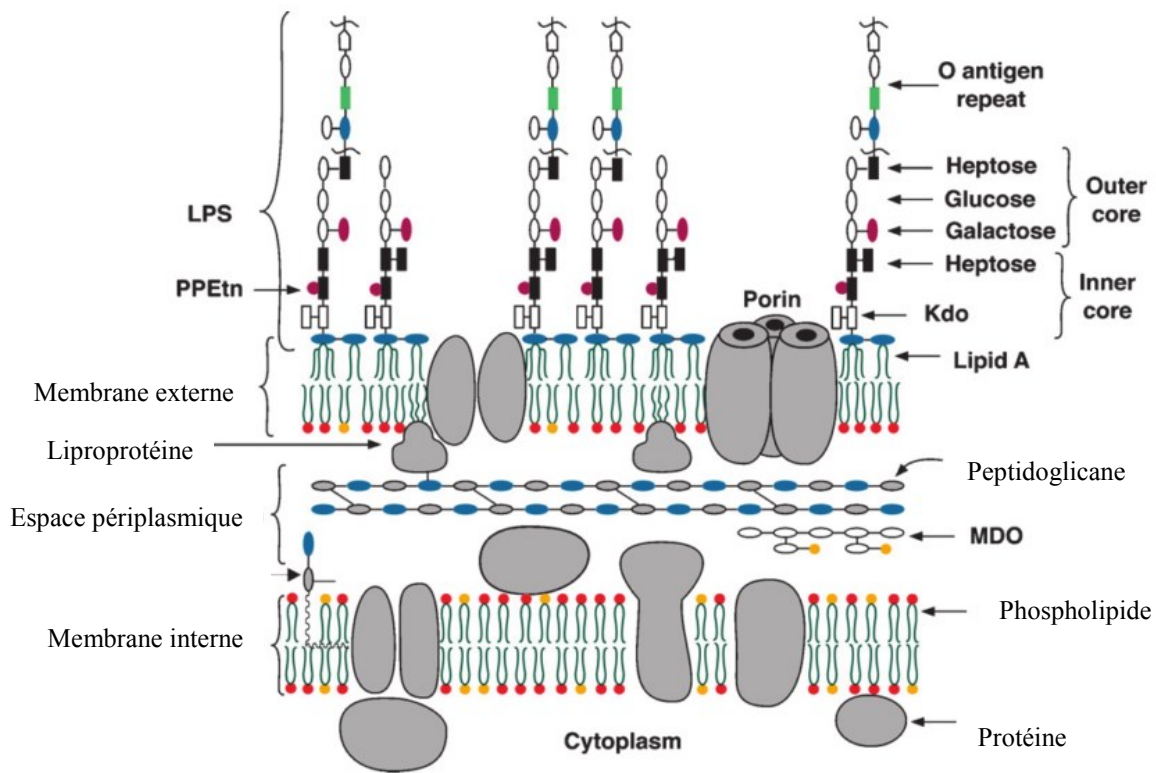


Figure 11 : Structure détaillée de la membrane des bactéries à Gram négatif. Adapté de (Clausell *et al.* 2007).

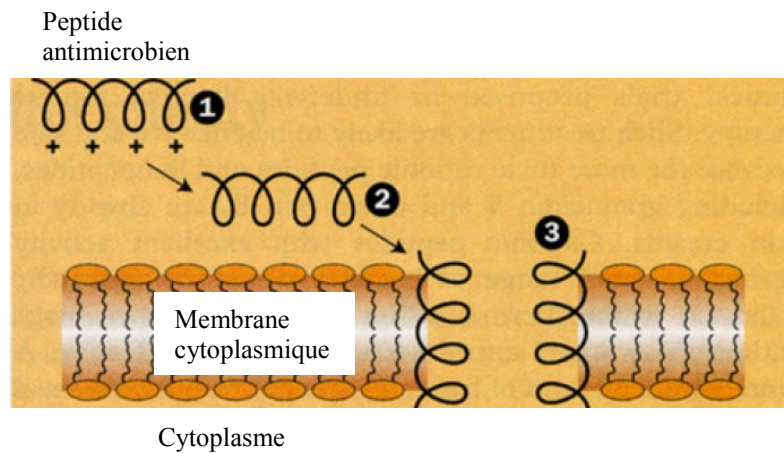


Figure 12 : Mécanisme d'action « classique » des peptides antimicrobiens. Adapté de (Hancock 1997)

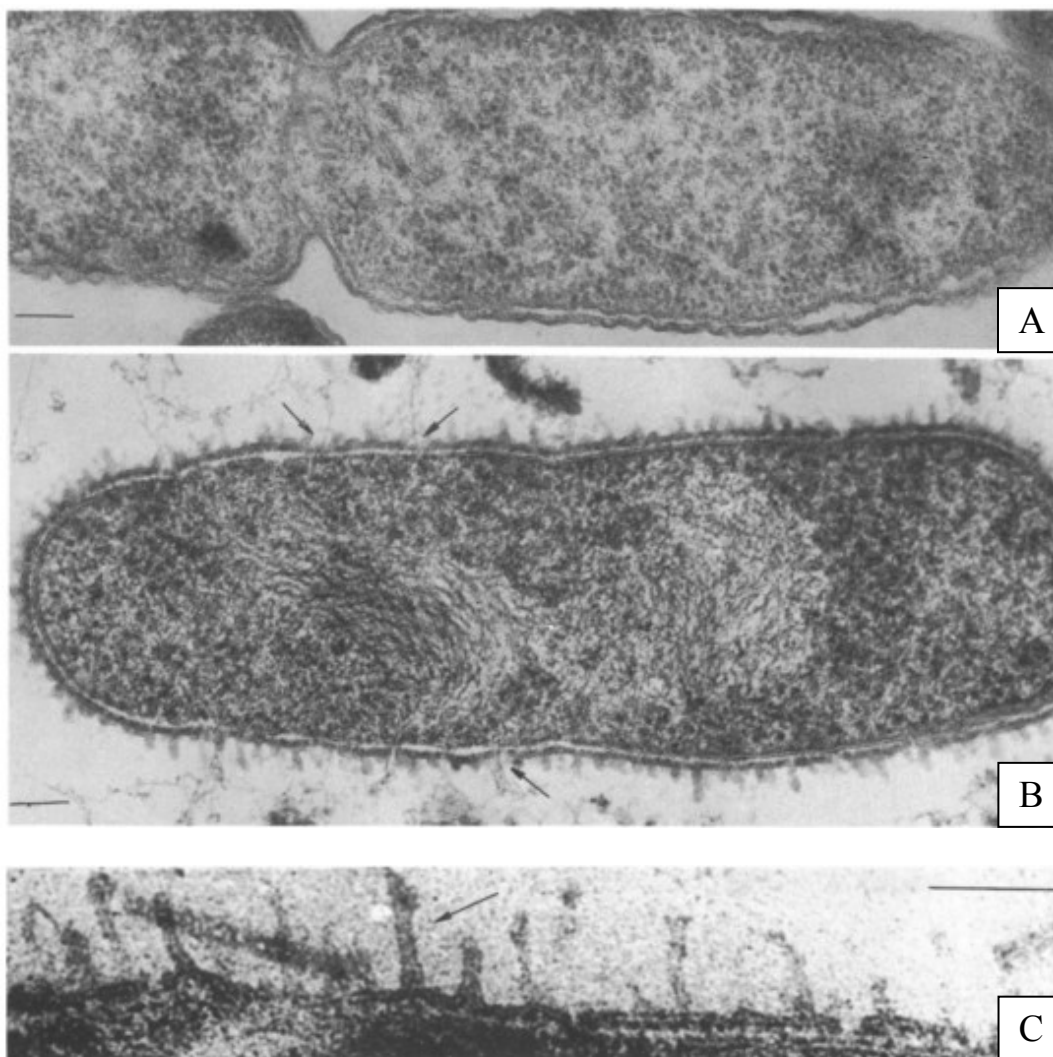


Figure 13 : Photo de microscopie électronique à transmission de *Pseudomonas aeruginosa*.  
 (A) non traité à un grossissement de 74 000 x (B) traité avec 25 µg de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 74000x (C) traité avec 25 µg de polymyxine B pendant 30 minutes à un grossissement de 190000x. Adapté de (Koike *et al.* 1969)

### **« Nouveau » mécanisme d'action**

Cependant, plusieurs auteurs mettent en doute ce mécanisme d'action. Tous s'entendent sur le fait que les charges positives de la colistine interagissent avec les charges négatives de la membrane externe et provoquent la formation de pores. Toutefois, la formation de pores n'engendrerait pas la mort de la cellule (Zhang *et al.* 2000, Yahav *et al.* 2012). Selon Yahav *et al.*, le mécanisme exact d'action demeure encore inconnu. Cependant, plusieurs auteurs suggèrent une activité intracellulaire de la colistine et de l'ensemble des peptides antimicrobiens. Tout d'abord, l'apport de colistine au niveau intracellulaire ou dans l'espace périplasmique se ferait par un mécanisme semblable à l'apport de néomycine. Dans un premier temps, la création de pores augmenterait l'internalisation de la colistine par le phénomène de l'absorption auto-induite (self-promoted uptake). Dans un deuxième temps, la colistine pourrait s'accumuler dans l'espace périplasmique. Une fois en quantité suffisante, elle pourrait lier des protéines et ainsi induire la mort cellulaire. Quelques protéines de la membrane ont été identifiées comme cibles potentielles. Par exemple, des protéines liées à la membrane ayant un rôle dans le processus respiratoire et des ATPases de type P. Ces dernières jouent un rôle important dans le maintien du potentiel électrostatique de la membrane en expulsant les ions hors de la cellule (Brogden 2005, Hale and Hancock 2007, Mogi and Kita 2009).

Il est également décrit que la colistine possède un effet anti-endotoxine. Lors de la mort d'une cellule bactérienne, plusieurs composantes de la bactérie sont relarguées dans le milieu extracellulaire et peuvent être toxiques pour les cellules avoisinantes. Ce processus intervient également dans les premières étapes du processus inflammatoire. Puisque les endotoxines sont constituées de la partie lipide A du LPS, la colistine peut aisément lier

l'endotoxine et ainsi inhiber son effet toxique (Rogers and Cohen 1986, Falagas and Kasiakou 2005, Wang and Quinn 2010, Yahav *et al.* 2012).

### **Mécanisme de résistance**

Afin de contrer l'action de la colistine, plusieurs bactéries ont développé différents mécanismes de résistance (Falagas *et al.* 2010, Olaitan *et al.* 2014). Les prochaines lignes porteront davantage sur les mécanismes de résistance d'*E. coli*. Le mécanisme général de résistance le plus décrit chez *E. coli* est associé à la modification du lipide A du LPS. Cette modification entraîne l'ajout d'un groupement 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) sur le lipide A, entraînant ainsi une augmentation de la charge du LPS et par le fait même une diminution de l'affinité pour la colistine.

La synthèse de L-Ara4N dépend des gènes de l'opéron *arn* anciennement connu sous le nom de l'opéron *pmr* pour « polymyxin resistance ». L'opéron *arn* comporte plusieurs gènes : *arnB*, *arnC*, *arnA*, *arnD*, *arnT*, *arnE* et *arnF* codant pour les protéines ArnB, ArnC, ArnA, ArnD, ArnT, ArnE et ArnF respectivement (Wang and Quinn 2010). Comme nous le montre la Figure 14, la synthèse du L-Ara4N débute avec un UDP-glucose qui sera déshydrogéné en acide UDP-glucuronique (UDP-GlcA) par la protéine Ugd anciennement appelée PmrE déhydrogénase. Par la suite, l'UDP-GlcA subira une décarboxylation par la protéine ArnA pour devenir le UDP-4-ketopentose qui subira une transamination par ArnB pour devenir le UDP-Ara4N. L'UDP-Ara4N est par la suite formylé par ArnA en UDP-Ara4NF et celui-ci est transféré du côté cytoplasmique de la membrane interne par la protéine ArnC. L'UDP-Ara4NF sera déformylé par ArnD. Par la suite, l'UDP-Ara4N sera transporté du côté du périplasme de la membrane interne de la bactérie. Ce mécanisme est



encore peu connu, mais des études suggèrent la participation de flipases ArnE et ArnF (Yan *et al.* 2007, Raetz *et al.* 2009). Lorsque l'UDP-Ara4N se retrouve du côté du périplasma, la protéine ArnT fera le transfert du groupement Ara4N sur le lipide A (Raetz *et al.* 2007, Falagas *et al.* 2010, Wang and Quinn 2010).

Cet ajout du groupement L-Ara4N augmente la charge du LPS jusqu'à sa neutralité. Un autre groupement est également ajouté au lipide A, le phosphoéthanolamine (pEtN). Ce groupement provoque également une augmentation de la charge, mais sans toutefois modifier la neutralité du LPS (Chen and Groisman 2013).

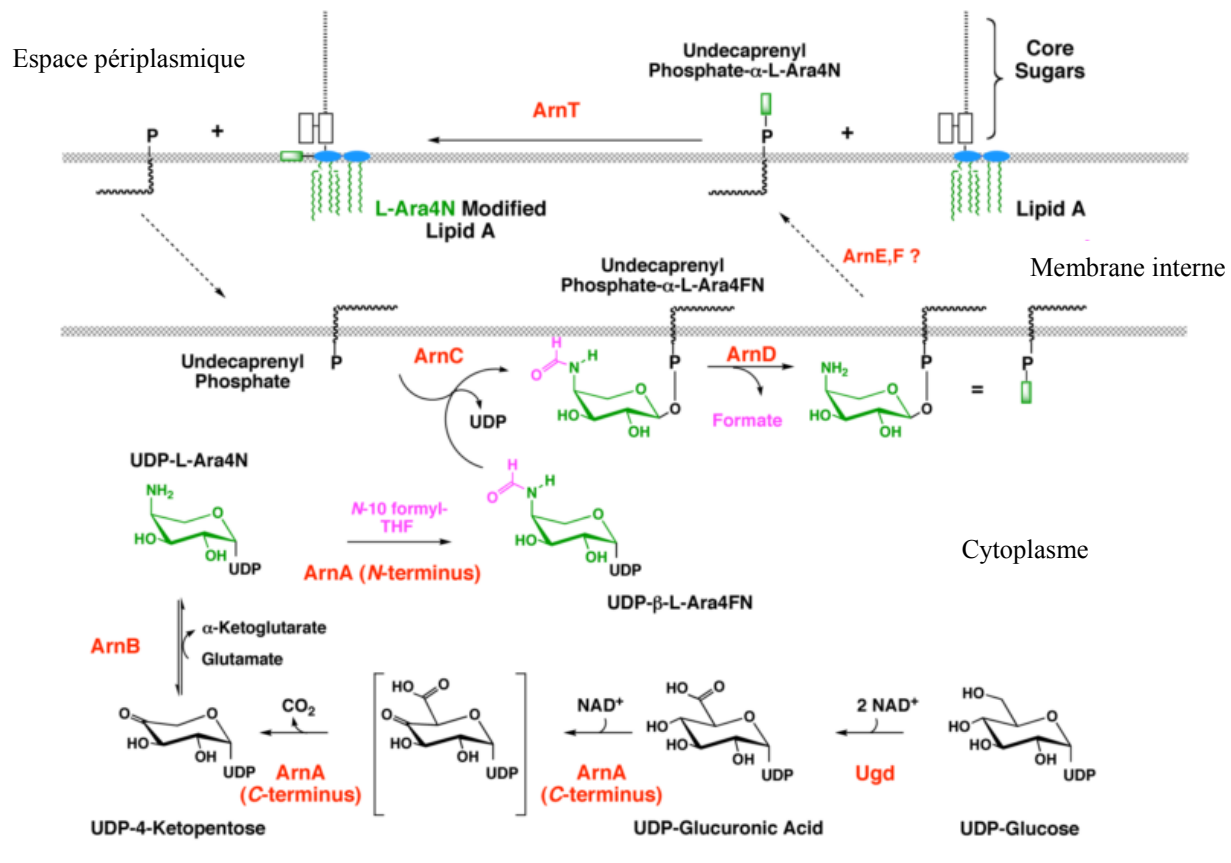


Figure 14 : Biosynthèse du L-Ara4N et son attachement au lipide A. Adapté de (Raetz *et al.* 2007).

## Régulation de la modification du LPS par PmrAB

L'ensemble des protéines responsables des ajouts des groupements L-Ara4N et pEtN est régulé par le système à deux composantes PmrA/PmrB. Il est rapporté que chez plusieurs bactéries à Gram négatif le système à deux composantes PhoP/PhoQ peut également engendrer des modifications du LPS et ainsi contribuer à la résistance à la colistine. Cependant, comme il est décrit à la Figure 15, chez *Salmonella*, en situation de faible concentration de magnésium ( $Mg^{2+}$ ), le récepteur transmembranaire PhoQ phosphorylera PhoP, qui se liera alors au niveau de l'ADN et induira la transcription de PmrD. Ce dernier activera PmrA et ainsi engendrera la transcription de l'ensemble de gènes responsables des modifications du LPS. Chez *E. coli*, en condition de faible concentration en  $Mg^{2+}$ , PmrD est transcrit, mais ne parvient pas à activer PmrA (Raetz *et al.* 2009, Chen and Groisman 2013, Olaitan *et al.* 2014). Donc, selon les études actuelles, chez *E. coli*, le système à deux composantes PhoP/PhoQ ne parvient pas à transcrire les gènes responsables de la modification du LPS.

Le système à deux composantes PmrA/PmrB est activé en réponse à l'environnement. Les protéines régulées par ce système sont activées en présence de haute concentration de fer ( $Fe^{3+}$ ), de haute concentration d'aluminium ( $Al^{3+}$ ) et d'un pH légèrement acide. Tout d'abord, le récepteur transmembranaire PmrB est activé dans les conditions précédemment mentionnées. Une fois activée, PmrB s'autophosphoryle et transfère ses groupements phosphorylés à PmrA qui devient phosphorylé à son tour. La PmrA phosphorylé (PmrA-P) est la forme active de la protéine qui se liera au niveau de l'ADN et activera l'expression des gènes responsables de la modification du LPS : l'opéron *arn* et le gène *ugd* qui sont responsables de la modification du lipide A par l'ajout du L-Ara4N, le gène *pmrC* qui est

responsable de l'ajout du pEtN. Les gènes *pmrG* et *pmrR* sont impliqués dans la modification du cœur du LPS (Nishino *et al.* 2006) et les gènes *wzz<sub>fepE</sub>* et *wzz<sub>ST</sub>* sont responsables de la modification de l'antigène O (Delgado *et al.* 2006, Holzer *et al.* 2009, Pescaretti Mde *et al.* 2011). La Figure 16 nous montre les enzymes responsables des modifications des différentes parties du LPS. Il est rapporté que la modification du cœur et de l'antigène O du LPS n'affecte pas la résistance à la colistine (Raetz *et al.* 2009, Chen and Groisman 2013). De plus, le PmrA-P est un inhibiteur de la protéine LpxT, dont la fonction est de phosphoryler le lipide A afin de permettre son transport vers la membrane externe. En empêchant le transport de nouveau lipide A à la membrane externe, il y a conservation d'une charge neutre du LPS. Le système PmrA/PmrB est capable de s'autoréguler. Cette autorégulation est due au fait que lorsque PmrB est activé par la présence de forte concentration en cations  $Fe^{3+}$ , il y a phosphorylation de PmrA qui, à son tour, engendrera l'expression de la protéine augmentant ainsi la charge net du LPS. L'augmentation de charge du LPS réduira l'attraction de  $Fe^{3+}$  à celui-ci et fera diminuer la concentration du fer au niveau de PmrB, ce qui diminuera à son tour la phosphorylation de PmrA (Winfield and Groisman 2004).

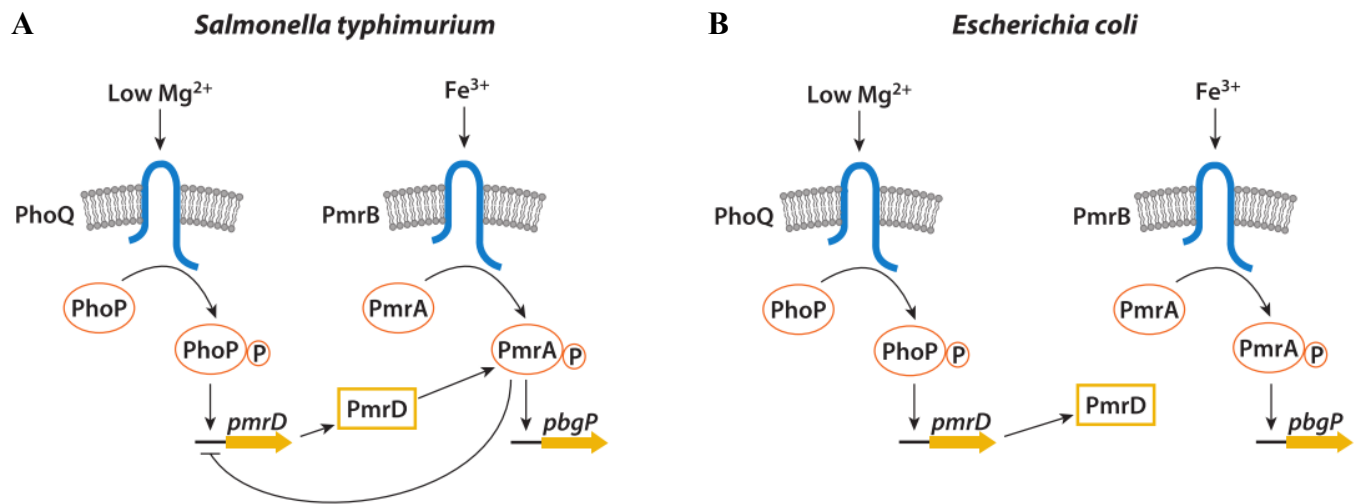


Figure 15 : Modèle d'interaction entre les systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB chez  
A : *S. typhimurium* et B : *E. coli*. Adapté de (Chen and Groisman 2013).

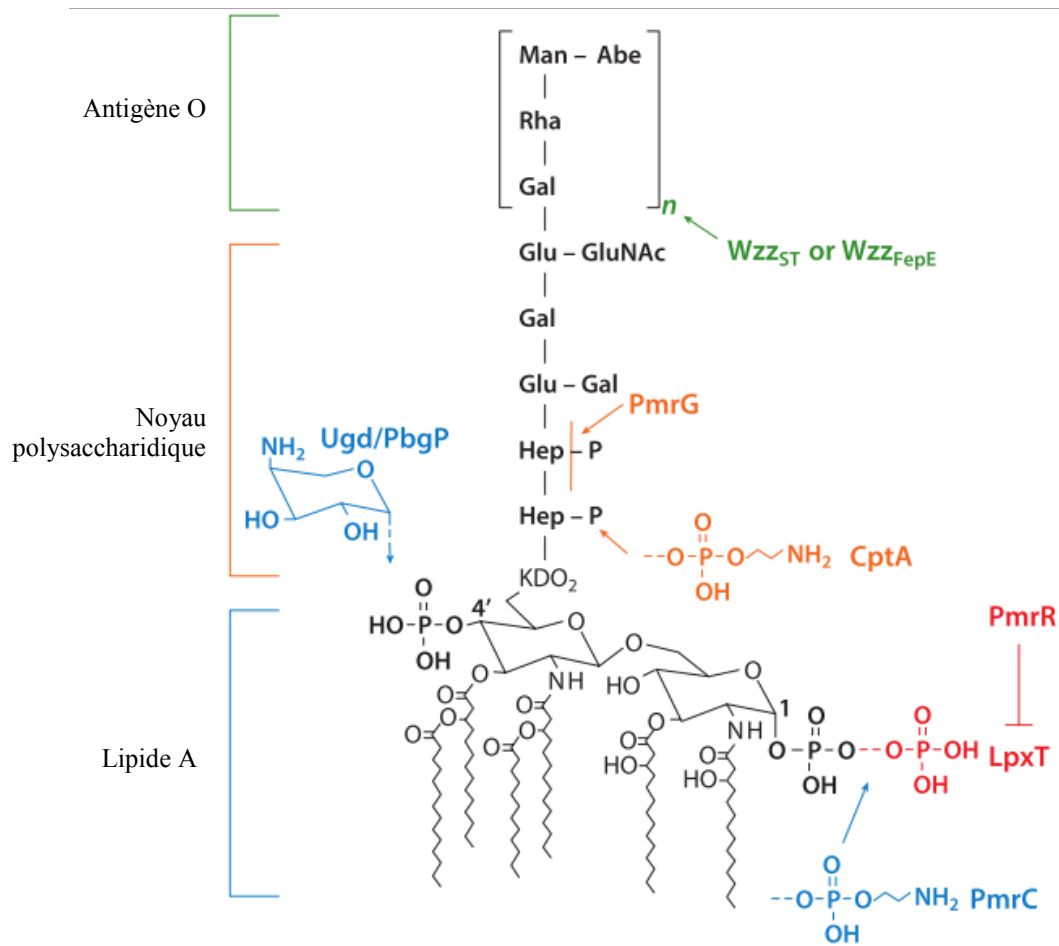
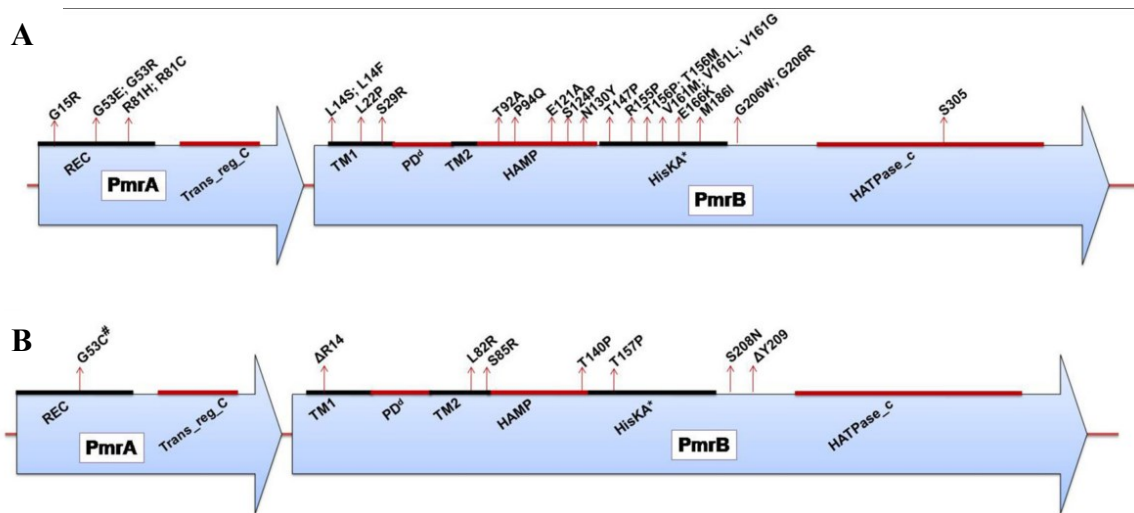


Figure 16 : Les différentes enzymes responsables de la modification du LPS régulés par PmrA. Adapté de (Chen and Groisman 2013).

### Résumé du mécanisme de résistance

Pour *E. coli*, la modification du LPS est le mécanisme privilégié de résistance à la colistine. Chez d'autres bactéries comme *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, il a été démontré que des mutations dans le système à deux composantes PmrA/PmrB entraînait l'activation de ce système de manière constitutive (Figure 17) (Olaitan *et al.* 2014), résultant en une

modification continue du LPS et ainsi à une résistance à la colistine. Seulement trois polymorphismes génétiques dans *pmrA* et un dans *pmrB* ont été démontrés chez *E. coli* soit S39I et R81S dans PmrA et V161G dans PmrB. Dans cette étude, les auteurs ont regardé la résistance à la colistine de 471 isolats d'*E. coli* provenant de matière fécale de porcs à l'abattoir entre 2011 et 2013 en Espagne. Sur ces 471 isolats seulement 2 étaient résistants à la colistine; un isolat avec deux polymorphismes dans PmrA (S39I et R81S) et l'autre isolat avec V161G dans PmrB. À la vue de ces résultats, les auteurs décrivent la résistance à la colistine comme un événement rare (0.4 %), ce qui est également rapporté dans la littérature (Kempf *et al.* 2013, Quesada *et al.* 2015). Ces auteurs ont décrits les trois premiers polymorphismes chez des *E. coli* d'origine porcine.



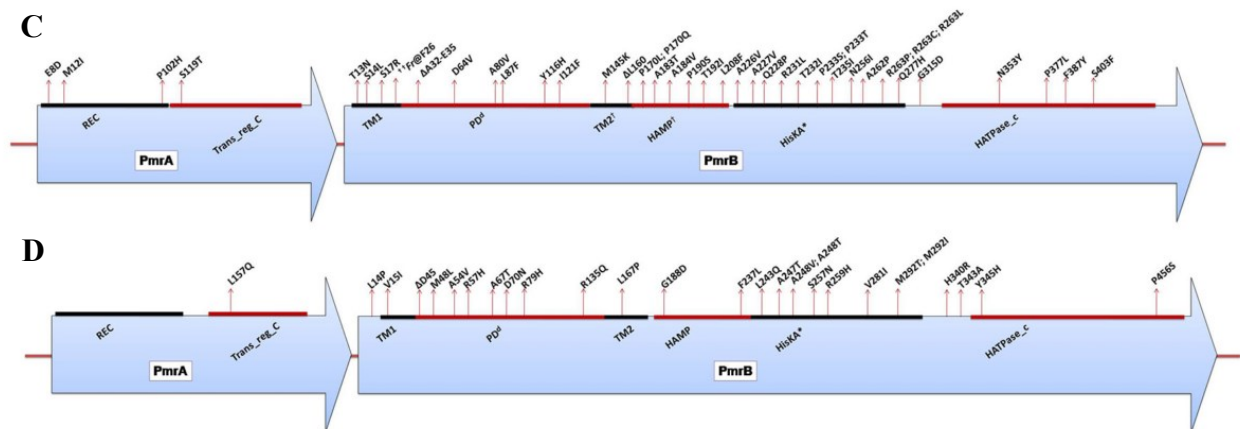


Figure 17 : Polymorphisme dans différent domaines des protéines PmrA et PmrB pour quatre bactéries; A : *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, B : *Klebsiella pneumoniae*, C : *Acinetobacter baumannii*, D : *Pseudomonas aeruginosa*. Adapté de (Olaitan *et al.* 2014).

Une étude a également démontré que la tyrosine kinase Etk serait impliquée dans la phosphorylation de la protéine Ugd modifiant ainsi son activité et entraînant une augmentation de l'acide UDP-glucuronique, précurseur du L-Ara4N. Etk est connu pour être exprimé dans les mêmes conditions que PmrA. Une étude suggère que Etk pourrait être régulée par une autre voie. Cependant, ce mécanisme est encore peu connu (Lacour *et al.* 2008, Kempf *et al.* 2013, Olaitan *et al.* 2014).

Récemment, le petit ARN *mgrR* a été retrouvé responsable de la résistance à la colistine chez *E. coli*. Celui-ci pourrait réguler négativement le gène *eptB* qui est responsable de la modification du LPS en ajoutant un groupement pEtN menant ainsi à la résistance à la colistine (Kempf *et al.* 2013, Needham and Trent 2013, Olaitan *et al.* 2014). Ceci indique que plusieurs mécanismes de résistance peuvent être présents chez *E. coli*.

## Problématique

À la lumière des informations précédemment mentionnées, nous devons constater que le phénomène de l'antibiorésistance force les vétérinaires-praticiens à recourir à de nouveaux moyens pour contrer les différentes infections auxquelles ils sont confrontés. Dans le cas qui nous concerne, la diarrhée post-sevrage causée par *E. coli* O149 devient de plus en plus difficile à traiter avec les antibiotiques habituellement utilisés, comme la néomycine. Les vétérinaires se tournent vers des pratiques hors-homologation en utilisant une molécule non autorisée au Canada, la colistine. Bien que cet antibiotique semble efficace sur le terrain pour traiter la diarrhée post-sevrage du porc, la résistance à la colistine chez *E. coli* est très peu connue. Le principal objectif de ce projet, est d'investiguer l'acquisition de la résistance à la colistine chez des isolats cliniques d'*E. coli* O149 *in vitro* et dans un modèle d'infection expérimentale chez le porcelet. Afin de répondre à cet objectif, nous allons tout d'abord établir une banque d'isolats cliniques d'*E. coli* O149 résistants à la néomycine et déterminer leurs taux de résistance à la colistine. Par la suite, nous allons créer des mutants résistants à la colistine et caractériser cette résistance. Pour terminer, nous allons évaluer l'acquisition de la résistance à la colistine chez divers isolats d'*E. coli* dans un modèle d'infection expérimentale de diarrhée colibacillaire chez le porcelet.



## **Méthodologie et Résultats**

## Article scientifique

(en préparation pour l'International Journal of Antimicrobial Agents)

Investigation of PmrA/PmrB polymorphism leading to colistin resistance in  
*Escherichia coli* O149 strain *in vitro* and in a clinical model of post-weaning diarrhea.

William Thériault<sup>1-2</sup>, Mohamed Rhouma<sup>1-2</sup>, Sylvette L-Lewandowski<sup>1</sup>, Marie Archambault<sup>2</sup>  
and Ann Letellier<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup> NSERC Industrial Research Chair in Meat Safety, Faculty of veterinary medicine,  
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada

<sup>2</sup> Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre, Department of Pathology and  
Microbiology, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street,  
Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6;

## Abstract

The post-weaning diarrhea is an important swine disease caused by *Escherichia coli* O149. The most frequent treatment is neomycin, but due to antimicrobial resistance, veterinarians are sometime using colistin sulfate (CS), an antibiotic of very high importance in human medicine in Canada. CS binds the LPS and causes the displacement of divalent cations leading to leakage of bacterial intracellular components. The two-component system PmrA/PmrB is the most frequently associated with CS resistance in *Salmonella* and *E. coli* by adding a 4-amino-4déoxy-L-arabinose (L-ara4N) group reducing the LPS affinity for colistin. The main objective of this study was to investigate the genetic polymorphism in *pmrA/pmrB* in *E. coli* strains acquired *in vitro* and in an infectious model of post-weaning diarrhea in piglets. We created 22 mutants resistant to colistin from clinical strains. MIC was determined by standard double dilution method and compared to the EUCAST breakpoint. By sequencing *pmrA* and *pmrB*, we identified seven new polymorphisms, 3 were in *pmrA* gene: A80V, N128I, S144G and 4 in *pmrB* gene : V87E, D148Y, D148V, T156M. We also found polymorphisms that have already been reported in other *enterobacteriaceae* namely, G15R in PmrA and V161G in PmrB. For the *in vivo* assay, we followed the experimental infection ETEC:F4 *E. coli* strain and some commensal *E. coli* isolates through a post-weaning infectious model. After *E. coli* confirmation, sequencing of *pmrA* and *pmrB* showed two polymorphisms G15R and T156M. Many of the *in vitro* and *in vivo* strains showed resistance to colistin without mutation in PmrA/PmrB two-component systems suggesting other(s) mechanism(s) of resistance to this antibiotic.

## Introduction

*Escherichia coli* O149 is the major cause of post-weaning diarrhea in Québec and in North America. The post-weaning diarrhea has an important economic impact (Fairbrother *et al.* 2005, Jamalludeen *et al.* 2007). Usually, veterinarians use neomycin, an aminoglycoside for treatment of this disease but unfortunately, nearly 40% of the treatments are unsuccessfully due to *E. coli* resistance to this antibiotic (Maynard *et al.* 2003). The most frequent mechanism of resistance is enzymatic modification. It is likely that the neomycin-inactivating enzymes are associated to the acetylation and the phosphorylation processes. Three genes are mostly associated with neomycin resistance; *acc(3)-IV*, *apk(3')-I*, *apk(3')-II*. Most of the time those genes are found on genetic mobile elements such as integrons, gene cassettes, transposons and conjugative plasmids (Ramirez and Tolmasky 2010).

To overcome this situation, veterinarians use colistin sulphate (CS), a polypeptide antimicrobial agent also call polymyxin E, but this antibiotic is not authorized for use in swine in Canada even if it seems to be effective against *E. coli* (Compendiums 2015). In other countries, this polypeptide antibiotic is recommended for oral therapy of intestinal infections in pig (Kempf *et al.* 2013). Polymyxin E is produced by *Bacillus polymyxa subsp. colistinus* and was used in 1960s in human medicine, but was rapidly replaced (1970s) because of its toxicity. Recently, due to a lack of new antibiotics, it becomes more difficult to treat infection due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. For this reason, we assist to a re-emergence of colistin and the Health Canada classification placed it as an antibiotic of very high importance in human medicine (Government of Canada 2012). Its usage in veterinary medicine is therefore not judicious (Lim *et al.* 2010, Yahav *et al.* 2012, Kempf *et al.* 2013).

The bactericidal activity of CS is against Gram negative bacteria, more specifically against Enterobacteriaceae with the exception of *Proteus* sp., *Serratia* sp. and *Providencia* sp. (Falagas *et al.* 2010). The target site is the lipopolysaccharide (LPS) molecule by a cationic interaction with the negative charges of LPS. This interaction is associated to a displacement of divalent cation, causing a leakage of intracellular contents and leading to bacterial death. By this mechanism of action, colistin has also an anti-endotoxin activity by binding the lipid A of LPS (Clausell *et al.* 2007, Falagas *et al.* 2010).

Resistance to colistin differs from an micro-organism to another: efflux pump are found in *Yersinia pestis*, in *Klebsiella pneumonia* production of capsule may result in colistin resistance and modification of the LPS in *Salmonella enterica* and *E. coli* also result in colistin resistance (Bengoechea and Skurnik 2000, Campos *et al.* 2004, Falagas *et al.* 2010). This LPS modification is mediated by the two-component systems PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ (Kempf *et al.* 2013). PhoP/PhoQ system is associated with a low  $Mg^{2+}$  concentration regulating the PmrA/PmrB system via the regulation of PmrD transcription. PmrD inhibits the PmrA dephosphorylation, promoting the transcription of *arn* genes (*pmr* operon) (Winfield and Groisman 2004, Falagas *et al.* 2010). This operon is associated with a modification of the LPS by adding a L-ara4N to the phosphate group of LPS core causing a reduction of negative charge, LPS becoming less negative (Kline *et al.* 2008, Kempf *et al.* 2013). PmrD is present in *E. coli*, but can not make the link with PhoP/PhoQ system (Winfield and Groisman 2004). PmrB is a transmembrane receptor with a histidine kinase activity. PmrB is activated in particular, by  $Fe^{3+}$ . Once activated, PmrB phosphoryl the transcription factor PmrA, resulting in the transcription of *arn* genes (Winfield and Groisman 2004). A mutation in the PmrA/PmrB system could constitutively activated this

system, leading to a CS resistance by decreasing the cationic liaison between CS and LPS (Gunn *et al.* 1998, Falagas *et al.* 2010, Kempf *et al.* 2013). In *A. baumannii* and *K. pneumonia* polymorphisms have been detected in these strains in patients treated with colistin (Rolain *et al.* 2013, Cannatelli *et al.* 2014, Quesada *et al.* 2015). Only three polymorphisms have been reported in swine *E. coli* isolates, two in *pmrA* gene and one in *pmrB* gene (Quesada *et al.* 2015). A few have been reported in *S. enterica* by an *in vitro* model for selection of mutants resistant to colistin (Sun *et al.* 2009).

The main objective of this study was to investigate mutations in the two-component system PmrA/PmrB associated to colistin resistance in *E. coli* isolates, *in vitro* and in an *in vivo* clinical model of post-weaning diarrhea in piglets.

## Materials & methods

Bacterial strain selection and antimicrobial susceptibility testing.

Seven (7) strains of *E. coli* O149 were selected from clinical cases in Québec, Canada from years 2008 to 2011 using the APZEC database (<http://apzec.ca>). These strains were tested for resistance to neomycin and colistin using a micro-dilution method and E-test, according to the CLSI 2011. Briefly, in sterile 96-well polystyrene microtitre plates, serial double dilutions were made in Muller Hinton (MH) broth from 128 mg/L to 0.25 mg/L for neomycin and 8 mg/L to 15 µg/L for colistin. Each well was inoculated with approximately  $5 \times 10^5$  CFU/ml of *E. coli* strains in MH broth. The MIC was determined as the lowest concentration that resulted in inhibition of bacterial growth. The ATCC 25922 *E. coli* strain was used as a control. The identification and characteristic of those strains are resume in Table II.

### Neomycin resistance characterization

In these isolates, PCR was used to determine the presence of antimicrobial resistance genes *acc(3)-IV* (F-GTGTGCTGCTGGTCCACAGC R-AGTTGACCCAGGGCTGTCGC), *apk(3')-I* (F-ATGGGCTCGCGATAATGTC R-CTCACCGAGGCAGTTCCAT) and *apk(3')-II* (F-GAACAAGATGGATTGCACGC R-GCTCTTCAGCAATATCACGG). PCR was carried out using these conditions: 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 45 sec (Maynard *et al.* 2003).

### Colistin mutant selection

Colistin mutants were created by incubation of each strain in Luria-Bertani broth (LB) with a colistin concentration below the MIC (0,01 mg/L). Serial passages were done on LB agar with 25xMIC and 50x MIC to selection mutants, as described by Sun et al. (Sun *et al.* 2009). Each variant was streaked on LB agar for 14 consecutive days to evaluate the stability of the resistance. At each day, variants were put on MH agar with 2 mg/L of colistin to confirm that the resistance was maintained.

### Determination of mutation rate

Mutation rate were calculated for the infection strain ECL8559 and for the lab strain ATCC 25922. Approximately  $10^8$  CFU from 25 independent cultures of two *E. coli* strains ATCC 25922 and ECL8559 were inoculated on MH agar containing 2 mg/L of colistin sulfate and incubated at 37°C overnight. The next day, the number of colonies with resistance to colistin was scored. The mutation rate was evaluated by the mean number of colonies with resistance to colistin divided by the total number of plated cells (Foster 2006, Sun *et al.* 2009). The same experience was realized in the same media added with 0,1 x MIC of CS in order to see the mutation rate induced by a sub-inhibitory concentration.

### DNA extraction, PmrA-PmrB PCR and sequencing

DNA was extracted by standard boiling method. Briefly, 2 ml of each sample was centrifuged at 12000 RPM for 5 min and supernatant was removed. A volume of 1 ml of FA buffer (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) was added. After vortexing, tubes were centrifuged at 12000 RPM for 2 min, supernatants were removed and 500 µl of sterile Milli-



Q water was added. After vortexing, tubes were heated at 95°C for 10 min. After centrifugation for 12000 RPM for 2 min, the DNA was recovered in the supernatant. Amplification of *pmrA* and *pmrB* genes was performed by PCR using respectively primers F-CAAACCTTGCAGGAGAGTGAG R-GCTGATCAGCTCAAACACCA and F-GGCTTTGGCTATATGCTGGT R-TTAACTACCGTGTTCAGCGT. PCR was performed using these conditions: for *pmrA* gene, 94°C for 5 min follow by 25 cycles of 94°C for 30 sec, 57.5°C for 30 sec and 72°C for 60 sec; for *pmrB* gene, 94°C for 5 min followed by 25 cycles of 94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec and 72°C for 75 sec. PCR products were purified with PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, Canada). Sequencing was performed by Sanger (Genome Québec). Alignments of sequences were done with Clustal X software.

## Animals

Twenty-four healthy Yorkshire/Landrace piglets, 21 day old (post-weaning age), were used in this study. Piglets were selected for the presence of F4 receptor gene by PCR-RFLP as previously described (Daudelin *et al.* 2011). Pigs were fed by a standard non-medicated ration for post-weaning pigs and received water *ad libitum*. The room temperature was kept at 24–26°C. This experimental study was conducted in a biosecurity level 2 agro-environment platform for farm animals of the Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV, Saint-Hyacinthe, QC, Canada) of the Université de Montréal. All procedures were approved by the ethical committee of the FMV based on the guide lines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

## Experimental infection

Animals were divided into two groups of 12 pigs each; treated and untreated groups. The challenge strain was an hemolytic nalidixic acid-resistant (Nal<sup>r</sup>) variant of ETEC: F4 strain ECL8559 (0149:LT: STa: STb: East1: paa: hem $\beta$ : F4), as previously described (Daudelin *et al.* 2011). The ETEC: F4 strain was kindly provided by the *E. coli* Laboratory at the Faculté de médecine vétérinaire (Saint-Hyacinthe, QC, Canada) of the Université de Montréal. After one week of acclimatation (at 27 days of age), a 10 ml of a CaCO<sub>3</sub> 1.2% solution was administrated to each pig, before the challenge with 5 mL of trypticase soy broth (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI, USA) containing 10<sup>9</sup> CFU of *E. coli* strain ECL8559. Both intra-oesophageal administrations (CaCO<sub>3</sub> and ECL8559 strain) were performed using a 10 ml syringes attached to a polyethylene tube. The CaCO<sub>3</sub> 1.2% solution was used in order to increase bacterial survival in the stomach and to aid safe transfer of the inoculum into the small intestine by rising the gastric pH as described by Daudelin et al. (Daudelin *et al.* 2011). Clinical examinations were monitored daily: observation of fecal consistency (score 0 to 3 : 0, normal; 1, soft feces; 2, mild diarrhea; and 3, severe diarrhea), rectal body temperatures measured by a digital thermometer, food intake and lethargy (Jamalludeen *et al.* 2009). As soon as 2-3 (10-15%) pigs showed clinical signs (fecal consistency score of 2-3), the treated group received a colistin sulfate treatment (2.4 mg/Kg twice a day during five days). The treatment was administered through an intra-oesophageal tube.

A day before the challenge and at day 1-7, d9, d12, d19, d26, d35 post-challenge, fecal swabs were taken for microbiological analysis. At d35 all pigs were euthanized with an intra-cardiac injection of 110mg/Kg of pentobarbital. Treatment with CS occurred from day 1 to day 5.

## Microbiology analysis of fecal samples

Swabs were weighted before and after the sampling. A volume of 1 ml of buffered peptone water was added and samples were vortexed at maximum speed for one minute. A volume of 100 µl of undiluted sample were plated on MacConkey agar containing 2 mg/L of colistin sulfate and plates were incubated at 37°C overnight. Typical *E. coli* colistin resistant strains were isolated on blood agar and freezed at -80°C for further analysis. Another 100 µl of undiluted samples were plated on 5% blood agar containing 50 mg/L and 2 mg/L of nalidixic acid and colistin sulfate respectively. Typical ETEC: F4 strains ECL8559 colistin resistant were isolated on blood agar and freezed at -80°C for further analysis.

The indole spot test was conducted on typical *E. coli* strain. DNA was extracted by standard boiling method, as previously described, on indole positive isolates and presence of *yccT* gene was performed for *E. coli* confirmation by PCR F-GCATCGTGACCACCTTGA R-CAGCGTGGTGGCAAAA using these PCR conditions: 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 15 sec, 54°C for 15 sec and 72°C for 15 sec (Clifford *et al.* 2012). Confirmation of ETEC:F4 strains ECL8559 were performed by multiplex PCR for virulence factor F4, STa, STb, Lt. Briefly, one reaction contained; 2 µl of MgCl<sub>2</sub> [20 mM], 2,5 µl of dNTP [2 mM], 2,5 µl of Tampon buffer [10×], 1 µl of each primers for STa [5 µM] and LT [10 µM], 1,25 µl of each primers STb and F4 [10µM], 0,2 µL of Taq DNA polymerase [5 U/µl] (New England Biolabs, Pickering, ON), 3,8 µl of sterile water and 5 µl of the DNA sample was added to bring the final volume to 25µl. Multiplex PCR was conducted under these conditions: 95°C for 2 min fallowed by 25 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec

and 72°C for 30 sec (Furrer *et al.* 1990, Lortie *et al.* 1991, Ojeniyi *et al.* 1994, Ngeleka *et al.* 2003). Amplification and sequencing of *pmrA* and *pmrB* genes were performed on confirmed *E. coli* strains and ETEC:F4 ECL8559 strains.

## Results

### *E. coli* strain and antimicrobial susceptibility

All selected strains (n=7) had a MIC higher than 128 mg/L for neomycin whereas MICs were between 0.064 to 0.125 mg/L for colistin, indicating that all strains were resistant to neomycin but all susceptible to colistin using a break-point of 2 mg/L (<http://www.eucast.org>). PCR detection of neomycin resistance genes showed that *apk(3')*-I was found in six strains. The strains 1000 and 2000 had two resistance genes respectively *acc(3)-IV*, *apk(3')*-I and *acc(3)-IV*, *apk(3')*-II (Table II).

### *In vitro* mutation rate

The *in vitro* mutation rate for colistin resistance was  $3,4 \times 10^{-8}$  for the ATCC 25922 strain and  $2,7 \times 10^{-8}$  for the ECL8559 strain without CS. In the presence of a sub-inhibitory concentration of CS the mutation rate was  $8,0 \times 10^{-8}$  for the ATCC25922 strain and  $1,2 \times 10^{-7}$  for the ECL8559 strain. We compared to the mutation rate for colistin resistant *Salmonella* Typhimurium in Sun et al. study, we observed a nearly 1 log lower of their mutation rate. This could be explained by the difference of colistin concentration used in the medium. We used the break-point concentration of 2 mg/L instead of 1.25mg/L in the Sun et al. study (Sun et al. 2009). We also see a difference of more than 1 log between mutation rate with sub-inhibitory concentration of CS and without CS for the ECL8559 strain but not for the ATCC 25922 strain.

### Characterization *in vitro* of CS resistance

The *in vitro* colistin mutants selection was done and 22 variants were created. The sequencing of the *pmrA* and *pmrB* genes showed 4 different mutations in *pmrA* gene and 5 in *pmrB* gene leading to a colistin resistance phenotype. In PmrA protein, a glycine in

residue 15 becomes an arginine (G15R), an asparagine in residue 128 becomes an isoleucine (N128I), a serine in residue 144 becomes a glycine (S144G) and an alanine in residue 80 becomes a valine. In PmrB protein, a valine in residue 87 becomes aglutamic acid (V87E), an aspartic acid in residue 148 becomes a valine (D148V) and a tyrosine (D148Y), a threonine in residue 156 becomes a methionine (T156M) and a valine in residue 161 becomes a glycine (V161G). These mutations are shown in Table III. Eleven (11) variants have a colistin resistant phenotype with no mutation in the *pmrA* and *pmrB* genes.

#### Characterization *in vivo* of CS resistance

In our pigs PWD infection model, nine (9) isolates were confirmed as *E. coli* and one isolate as ETEC:F4. The ETEC:F4 strain was the only one with a *pmrA* gene mutation a glycine in residue 53 becomes an arginine (G53R). Out of the nine (9) *E. coli* isolates, only three (3) (M6A11, M6B11 and M6C11) have a *pmrB* gene mutation, a threonine in residue 156 becomes a methionine (T156M), and all three has de same mutation. The other six (6) *E. coli* resistant isolates have no mutation in those two genes. (Table IV)

## Discussion

The PmrA-PmrB two-component system is the most documented to be involved in the colistin resistance (Sun *et al.* 2009, Falagas *et al.* 2010, Kempf *et al.* 2013, Quesada *et al.* 2015). In the present work, we identified many *E. coli* mutants with polymorphisms leading to the colistin resistance phenotype.

Among the 22 variants resistant identified in the *in vitro* assay, 4 genetic polymorphisms were found in *pmrA* gene. The genetic polymorphism G15R is on the phosphorylation acceptor domain of the protein and has been reported in *Salmonella* (Sun *et al.* 2009). The mutation A80V is, to our knowledge, reported here for the first time in *E. coli* in this study. Mutation in residue 81 has been reported in *Salmonella* and *E. coli* that could indicating possible link between these 2 residues (Sun *et al.* 2009, Quesada *et al.* 2015). This mutation may also affect the phosphorylation domain (Sun *et al.* 2009). Two other polymorphisms S144G and N128I have been found in the same variant 0001 and both occur in the DNA binding domain of PmrA (Sun *et al.* 2009). Those are, to our knowledge, reported for the first time in *E. coli* colistin resistant strain.

In the PmrB, we have found one mutation, V161G, that have been previously found in *Salmonella* and *E. coli* (Sun *et al.* 2009, Quesada *et al.* 2015). We found a mutation in a residue that has been previously identified in *Salmonella*, but with a different polymorphism, T156M instead of T156P in *Salmonella* (Sun *et al.* 2009). Such a result could indicate that this residue is important for colistin resistance. We also identified a residue in the same histidine phosphotransferase domain in PmrB, residue 148. Two new and different polymorphisms have been seen in this study D148Y and D148V. We also

identified, to our knowledge, the first polymorphism in the transmembrane domain 2 V87E (Sun *et al.* 2009).

For the *in vivo* part of the study, only one ETEC:F4 (L10A4) resistant to colistin was confirmed with a polymorphism in the PmrA (G53R) in a untreated pig, suggesting a very low level of spontaneous mutation in the experimental infection strain. This supports the proposal that resistance to colistin in pigs is a rare event (Kempf *et al.* 2013, Quesada *et al.* 2015). This *in vitro* colistin acquired resistance has been reported in *Salmonella*, but our study is the first to report this mutation in a *E. coli* ETEC:F4 strain isolated from pigs. Nine (9) other *E. coli* isolates that originated from the commensal pig flora possess a colistin resistant phenotype, but only 3 of them showed a mutation in *pmrB* gene T156M. This polymorphism has been observed *in vitro* and *in vivo* in our study. As previously discussed this mutation may affect the histidine phosphotransferase domain of PmrB (Sun *et al.* 2009). All the MIC from the *in vitro* and *in vivo* part of this study was between 3 mg/L to 12 mg/L. Those results are higher than the EUCAST breakpoint of 2 mg/L (<http://www.eucast.org>). Even with those polymorphisms we cannot associate a specific polymorphism with a specific MIC values.

More interestingly, many *E. coli* isolates are phenotypically resistant to colistin, but have no mutation in *pmrA* or *pmrB* genes, suggesting other(s) mechanism(s) of resistance (Quesada *et al.* 2015). Many other gram negative bacteria possess other mechanism of colistin resistance, such as efflux pump (Bengoechea and Skurnik 2000, Falagas *et al.* 2010), colistinase (Ito-Kagawa and Koyama 1980, Falagas *et al.* 2010), biofilm formation (Pamp *et al.* 2008, Falagas *et al.* 2010), or associated to capsule polysaccharide formation (Campos *et al.* 2004, Falagas *et al.* 2010). Our results suggest that the two-component PmrA-PmrB



system is important for the resistance to colistin, but it is not the only mechanism leading to a colistin resistance (Falagas *et al.* 2010, Quesada *et al.* 2015).

To conclude, the *in vitro* assay in this study generated colistin resistant *E. coli* isolates harboring 3 new polymorphisms in PmrA: A80V, N128I and S144G ; and also 3 polymorphisms in PmrB: V87E, D148Y and D148V. We also reported 3 polymorphisms that have already been reported in *Salmonella* and/or *E. coli* (G15R in PmrA and V161G, G53R in PmrB). To our knowledge, we are the first to report the G53R mutation in PmrA and the T156M mutation in PmrB in *E. coli* isolates from an animal source. This colistin resistance could be of public health concern knowing that this antimicrobial agent is classified as very high importance in human medicine in Canada (Government of Canada 2012). Furthermore, our results indicated that many *E. coli* isolates showed resistance to colistin without polymorphism in the PmrA/PmrB system suggesting other(s) mechanism(s) resistance. Further studies are needed to better understand the colistin resistance acquisition and should be part of a judicious use of therapeutic antimicrobial agents has an integral part of good veterinary practices.

## **Acknowledgment**

The authors would like to thank all staff and students of the Industrial Research Chair in meat safety for their help in this project.

## **Funding**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and financial partners in the Industrial Research Chair in meat safety.

## Tables

Table II : Characterization of clinical selected swine strains of *E. coli* 0149 through 2008 to 2011.

# ECL strain	Strain ID	Years	Virotype	MIC Neomycin (mg/L)	Resistance genes to noemycin	MIC Colistin (mg/L)
ECL15281	1000	2008	LT:STb:Paa:F4	512	<i>acc(3)-IV</i> , <i>apk(3')-I</i>	0,094
ECL16015	2000	2009	LT:STb:East1:F4	128	<i>acc(3)-IV</i> , <i>apk(3')-II</i>	0,125
ECL16347	3000	2009	LT:STb:Paa:F4	128	<i>apk(3')-I</i>	0,064
ECL16914	4000	2009	LT:STb:Paa:F4	128	<i>apk(3')-I</i>	0,094
ECL17026	5000	2010	LT:STb:East1:F4	128	<i>apk(3')-I</i>	0,125
ECL17291	7000	2010	LT:STb:F4	256	<i>apk(3')-I</i>	0,125
ECL17393	8000	2010	LT:STb:East1:Paa:F4	512	<i>apk(3')-I</i>	0,064
ATCC 25922	0	-	-	4	-	0,125
ECL8559	-	-	LT: STa: STb: East1: paa: hemβ: F4	8	-	0,125

Table III : *In vitro* mutants selection and characterization of their resistance to colistin.

Strain	# Variant	PmrA mutation	PmrB mutation	MIC Colistin (mg/L)
		G15R,		
ATCC 25922	0001	N128I,		6
		S144G		
ATCC 25922	0002	G15R		12
ATCC 25922	0003		T156M	12
ATCC 25922	0004	A80V		6
ATCC 25922	0005	A80V		8
ATCC 25922	0006		V161G	3
ATCC 25922	0007	A80V		6
ATCC 25922	0008	A80V		8
ATCC 25922	0009			8
ECL16015	2003		D148Y	6
ECL16347	3013			12
ECL 16914	4001			6
ECL 16914	4002			3
ECL 16914	4003			8
ECL 16914	4004			4
ECL 16914	4006			6
ECL 16914	4009			8
ECL 16914	4010			8

ECL 17026	5001	V87E	4
ECL 17291	7003	D148V	8
ECL 17393	8002		6
ECL 17393	8004		6

Table IV : *E. coli* isolates recovered after an experimental infection and characterization of their resistance to colistin.

Strain	Group	# pork	Days	MIC		
				PmrA mutation	PmrB mutation	Colistin (mg/L)
M4A3	infected treated	4	3			8
M4B3	infected treated	4	3			8
M4C3	infected treated	4	3			8
M4D3	infected treated	4	3			8
M6A11	infected treated	6	11		T156M	>8
M6C11	infected treated	6	11		T156M	8
M6B11	infected treated	6	11		T156M	8
L10A4*	infected untreated	10	4	G53R		8
L1B1	infected untreated	1	1			4
N2A1	uninfected treated	2	1			>8

\* : Challenge strain.

## **Discussion générale**

Ce projet de recherche avait comme objectif d'investiguer l'acquisition de la résistance à la colistine chez des souches d'*E. coli* O149 *in vitro* et dans un modèle d'infection expérimental de diarrhée post-sevrage chez le porcelet. Pour ce faire, nous avons tout d'abord, constitué une banque de souches d'*E. coli* O149 provenant de cas de diarrhée post-sevrage chez le porc. Par la suite, pour nous rapprocher le plus possible de notre problématique, nous avons sélectionné des souches ayant une résistance à la néomycine et une sensibilité à la colistine. Sept souches furent utilisées afin de créer des mutants résistants à la colistine. Ces sept souches étaient toutes résistantes à la néomycine avec des CMI supérieures à 128 µg/ml et étaient toutes sensibles à la colistine avec des CMI se situant entre 0,064 µg/ml et 0,125 µg/ml. Ces sept souches étaient résistantes à la néomycine grâce à des modifications enzymatiques. Deux souches possédaient deux gènes codant pour des enzymes, soit : Pour la souche 1000, *acc(3)-IV* et *apk(3')-I* qui codent pour une acétyl-transférase et une phosphotransférase respectivement et pour la souche 2000, *acc(3)-IV* et *apk(3')-II* qui codent également pour une acétyl-transférase et une phosphotransférase. Les autres souche possédaient uniquement le gène *apk(3')-I*.

Par la suite, pour la partie *in vitro* de cette étude, nous avons créé 22 variants d'*E. coli* résistants à la colistine. Afin de nous assurer que la résistance de ces souches était stable, nous avons fait des passages successifs sur un milieu sans colistine et à chaque passage nous avons vérifié la persistance de la résistance.

En ce qui concerne la caractérisation de la résistance étudiée, le système à deux composantes PmrA/PmrB est le plus souvent incriminé, dans la littérature, dans la résistance à la colistine (Sun *et al.* 2009, Falagas *et al.* 2010, Kempf *et al.* 2013, Quesada *et al.* 2015) que ce soit chez *E. coli* ou chez d'autres bactéries à Gram négatif. Dans cette étude, nous

avons identifié plusieurs mutations dans les gènes *pmrA* et *pmrB* (polymorphisme génétique) qui entraînaient un phénotype de résistance à la colistine. Nous avons identifié 4 polymorphismes dans PmrA soit : G15R, A80V, S144G et N128I. Le premier polymorphisme G15R se trouve dans le domaine accepteur de la phosphorylation. Ce polymorphisme a déjà été décrit chez *Salmonella Typhimurium* par Sun et al. (Sun *et al.* 2009, Olaitan *et al.* 2014). Cependant à notre connaissance, il s'agit de la première fois qu'il est retrouvé chez *E. coli*. Le second polymorphisme observé est le A80V. Cette mutation se retrouve également dans le domaine accepteur de la phosphorylation de PmrA. Le résidu 80 de PmrA est pour la première fois relié à un phénotype de résistance à la colistine. Des polymorphismes ont été démontrés pour le résidu 81 par plusieurs auteurs (Sun *et al.* 2009, Olaitan *et al.* 2014, Quesada *et al.* 2015) elle serait responsable de l'activation constitutive du système à deux composantes PmrA/PmrB. Pour les troisièmes et quatrièmes polymorphismes, S144G et N128I ont tous deux été observées dans le même variant de la souche ATCC 25922. Ces deux mutations prennent place dans le domaine de liaison à l'ADN. Les quatre polymorphismes que nous avons observés sont documentés pour la première fois chez *E. coli*.

Concernant le gène *pmrB*, chez les 22 variants obtenus *in vitro*, nous avons observé 5 polymorphismes différents soit : V87E, D148Y, D148V, V161G et T156M. Le premier polymorphisme est le V87E et se situe dans le domaine transmembranaire 2. À notre connaissance, il s'agit du premier polymorphisme à se trouver dans le domaine transmembranaire 2 chez *E. coli* et *S. Typhimurium*. Des polymorphismes génétiques ont déjà été observés dans le domaine transmembranaire 2 chez d'autres bactéries à Gram négatif. Comme L82R et S85R chez *K. pneumoniae*, M145K et ΔL160 chez *A. baumannii*

et L167P chez *P. aeruginosa*. Cependant, malgré la présence des gènes *pmrA* et *pmrB* chez plusieurs bactéries à Gram négatif, ceux-ci sont très différents. Les PmrA/PmrB de *S. Typhimurium* et ceux de *E. coli* sont très similaires et peuvent être comparés (Quesada *et al.* 2015). L'ensemble des autres polymorphismes observés dans notre étude se trouve dans le domaine de phosphotransférase également appelé histidine kinase. Le résidu 148 semble important chez *E. coli* puisque deux polymorphismes différents ont été observés pour la première fois sur celui-ci soit le D148Y et le D148V, et ce chez deux souches différentes. Deux autres polymorphismes le T156M et le V161G ont été observés chez *E. coli*. Ceux-ci ont déjà été rapportés chez *S. Typhimurium*, mais à notre connaissance, il s'agit de la première fois chez *E. coli* (Sun *et al.* 2009, Olaitan *et al.* 2014, Quesada *et al.* 2015).

Nous avons également calculé le taux de mutation de deux souches soit l'ATCC 25922, dont le taux de mutation est de  $3,4 \times 10^{-8}$ , et la souche utilisée pour l'infection expérimentale ECL8559, dont le taux de mutation était  $2,7 \times 10^{-8}$ . Ces taux de mutation sont près de 1 log inférieurs à celui de *S. Typhimurium* observés par Sun *et al.* (Sun *et al.* 2009). Cette différence peut cependant être expliquée par le fait que la sélection des variants résistants dans l'étude de Sun *et al.* s'est faite sur un milieu contenant une concentration inférieure en colistine comparé à notre étude. Nous avons également calculé le taux de mutation avec une concentration sous-inhibitrice de colistine, soit  $0,1 \times$  la CMI. Nous avons obtenu un taux de mutation de  $8,0 \times 10^{-8}$  pour la souche ATCC 25922 et de  $1,2 \times 10^{-7}$  pour la souche ECL8559. Nous pouvons observer une augmentation d'au moins 1 log pour la souche ECL8559 entre les taux de mutation avec ou sans colistine, cette différence n'est pas retrouvé chez la souche ATCC 25922. Cette dernière observation peut être dû au fait que la



souche ATCC 25922 est une souche de laboratoire non virulente et possiblement avec une capacité d'adaptation moindre.

Afin de valider les observations faites *in vitro*, nous avons évalué des souches issues d'un modèle d'infection expérimentale chez le porcelet. Dans la partie *in vivo*, un variant résistant à la colistine de la souche ETEC : F4 utilisée pour l'infection n'a été retrouvé qu'une seule fois (L10A4) chez le groupe non traité, ce qui suggère un très faible taux de mutations spontanées de la souche infectieuse. Cette observation est corroborée par plusieurs études qui rapportent le taux de résistance à la colistine comme un événement rare (Kempf *et al.* 2013, Quesada *et al.* 2015). Le polymorphisme observé chez ce variant de la souche ETEC : F4 est le G53R de la protéine PmrA, qui a déjà été observé chez *S. Typhimurium*. Ce résidu semble également important chez *K. pneumoniae* puisqu'un polymorphisme a été décrit sur ce même résidu (G53C) (Olaitan *et al.* 2014). Cependant, cette mutation est rapportée pour la première fois chez *E. coli* chez une souche infectieuse dans un modèle en conditions contrôlées chez le porc. Neuf autres isolats résistants à la colistine ont été récupérés de l'infection expérimentale. Ces isolats, provenant de la flore commensale du porc et ne possédaient pas les facteurs de virulence des ETEC. De ces neuf isolats, seulement 3 ont montré une mutation dans les gènes *pmrA* et *pmrB*. Ces 3 isolats ont été isolés à partir du groupe infecté et traité à la colistine et proviennent tous du même porc et le même jour soit au jour 19 de l'expérimentation (14 jours après la dernière administration du traitement) (M6A11, M6B11 et M6C11) et possèdent la même mutation dans *pmrB* soit la T156M. Tel que mentionné précédemment, cette mutation a déjà été observée chez *S. Typhimurium* et dans la partie *in vitro* de notre étude.

L'ensemble des concentrations minimales inhibitrices (CMI) associées à ces mutations sont entre 3 µg/ml et 12 µg/ml. Ces résultats étant supérieurs au seuil de résistance situé à 2 µg/ml selon l'EUCAST (<http://www.eucast.org>). Il n'a pas été possible de faire d'association entre la valeur de la CMI et les différentes mutations des gènes *pmrA* et *pmrB*. Un aspect très intéressant de cette étude, est que beaucoup de variants obtenus *in vitro* (environ 50%) ou *in vivo* (environ 60%) ne démontrent pas de polymorphismes génétiques dans les gènes *pmrA* et *pmrB*, ce qui suggère d'autre (s) mécanisme(s) de résistance. Comme précédemment mentionné dans cet ouvrage, d'autres mécanismes chez *E. coli* ont déjà été rapportés dans la littérature, par exemple ceux qui impliquent les gènes *etk* et *mgrR*. Etk est une tyrosine kinase qui phosphoryle la protéine Ugd augmentant ainsi son activité. Un mutant délété pour le gène *etk* possède un taux de survie réduit en présence de polymyxines (Lacour *et al.* 2008). Les conditions dans lesquelles *etk* est exprimé sont également connues pour activer le système à deux composantes PmrA/PmrB (Wosten and Groisman 1999, Lacour *et al.* 2008). Cependant, des études rapportent des résultats contradictoires concernant l'activation de Ugd par PmrA (Aguirre *et al.* 2000). Il est donc possible que *etk* soit le principal activateur de Ugd. Ceci impliquerait que la protéine Etk serait partiellement reliée à la résistance à la colistine.

Un autre mécanisme présent chez plusieurs bactéries à Gram négatif et qui a également été rapporté chez *E. coli* est le petit ARN (sRNA) *mgrR*. Il s'agit en fait d'un ARN non codant capable de réguler d'autres systèmes. Il a été décrit que *mgrR* régule négativement le gène *eptB* responsable de l'ajout de groupement pEtN. Une délétion de *mgrR* chez *E. coli* amplifierait la résistance à la colistine en augmentant les modifications du LPS par l'ajout

de pEtN. Il a également été démontré que *mgrR* pourrait réguler le système à deux composantes PhoP/PhoQ (Moon and Gottesman 2011, Olaitan *et al.* 2014).

Très récemment, Rubin *et al.* (Rubin *et al.* 2015) ont démontré que la protéine PmrD est requise chez *E. coli* pour permettre la modification du LPS dans des conditions de carence en  $Mg^{2+}$ . Cette protéine assure le lien entre les systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB chez *Salmonella sp.* était, jusqu'à ce jour, considérée comme incapable de faire ce lien chez *E. coli*. De plus, ces auteurs ont démontré la présence d'un facteur inconnu capable d'activer la modification des LPS par PmrD, indépendamment du système PhoP/PhoQ. Ceci démontre le réseau complexe d'interactions protéiques responsable de la modification du LPS (Rubin *et al.* 2015), lequel est associé à la résistance à la colistine.

Une investigation des deux mécanismes précédemment discutés pourrait permettre d'expliquer les divers variants de *E. coli* résistants à la colistine sans mutation identifiée dans les gènes *pmrA* et *pmrB*. Cependant, d'autres mécanismes de résistance ont été observés chez d'autres bactéries à Gram négatif et pourraient constituer de futures pistes pour expliquer la résistance à la colistine. Elles seront abordés dans les prochains paragraphes.

Chez *S. Typhimurium*, le principal mécanisme de résistance est, comme pour *E. coli*, une modification du LPS par le système à deux composantes PmrA/PmrB. Chez *S. Typhimurium*, le système à deux composantes PhoP/PhoQ est également impliqué dans la modification du LPS. Les mutations rapportées dans ces deux systèmes conduisent à leur activation constitutive, ce qui entraîne des modifications au niveau du LPS (ajout des groupements L-Ara4N et pEtN) (Roland *et al.* 1993, Guo *et al.* 1997, Gunn *et al.* 1998, Zhou *et al.* 2001, Lee *et al.* 2004). De plus, le 1-phosphate du lipide A peut être

phosphorylé et devenir un 1-diphosphate par l'action de la protéine LpxT. Ce changement provoque une diminution de la charge du LPS réduisant par le fait même l'efficacité de la modification par le pEtN et L-Ara4N. L'activité de LpxT est inhibée par l'activation de *pmrA* par PrmR, ce qui augmente ainsi la résistance à la colistine. Cependant, l'importance de LpxT dans la résistance à la colistine n'est pas encore totalement comprise, mais semble une avenue intéressante à explorer puisque cela implique directement la charge du LPS (Jones *et al.* 2008, Touze *et al.* 2008, Herrera *et al.* 2010, Kato *et al.* 2012). Une autre protéine ayant la possibilité de modifier le LPS est PapL. PapL a comme fonction de déacétyler le R-3-hydroxymyristate en position 3 du lipide A chez les souches incapables de modifier leurs LPS par les groupements L-Ara4N et pEtN augmentant ainsi la résistance aux polymyxines. Cette protéine est un bel exemple de la complexité des différents systèmes impliqués dans la modification du LPS, lesquels peuvent se compenser les uns aux autres (Kawasaki *et al.* 2005, Kawasaki *et al.* 2007). Un autre phénomène également observé chez *S. Typhimurium* est la myristoylation du lipide A. Il s'agit de l'association d'un groupement carboxylique et d'un acide myristique, qui a pour fonction de permettre un lien protéine-protéine ou protéine-lipide. Un mutant délété pour le gène *lpxM* produit des lipides A qui ne peuvent être myristoylés. Cette myristoylation du lipide A est essentielle pour l'addition de groupements L-Ara4N et pEtN, en conséquence, un mutant  $\Delta lpxM$  est donc plus sensible aux polymyxines (Tran *et al.* 2005).

Chez *K. pneumoniae*, il est rapporté que les systèmes à deux composantes PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ comme ayant une importance dans la résistance à la colistine. De la même manière que pour *E. coli* et *S. Typhimurium*, des mutations dans les gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* et *phoQ* peuvent rendre le système continuellement activé (Helander *et al.* 1996,

Cheng *et al.* 2010, Velkov *et al.* 2013, Cannatelli *et al.* 2014, Jayol *et al.* 2014, Olaitan *et al.* 2014). Récemment, un autre mécanisme menant à la résistance aux polymyxines a été découvert, il s'agit de l'inactivation du gène *mgrB*. Le gène *mgrB* code pour un petit peptide de 47 acides aminés, qui exerce une régulation négative sur le système PhoP/PhoQ en inhibant l'activité kinase de PhoQ ou en stimulant son activité phosphatase. Ceci entraîne une diminution de la phosphorylation de PhoP (Cannatelli *et al.* 2014). On rapporte dans la littérature plusieurs perturbations (mutations, délétions, insertions ou inactivations) de *mgrB* liées à la résistance aux polymyxines. L'ensemble de ces perturbations mène à une sur activation de l'opéron *arn* par l'activation de PmrA par PmrD qui est fonctionnel chez *K. pneumoniae* contrairement au PmrD de *E. coli*. Les mutants dans les gènes *mgrB* semblent plus résistants aux polymyxines que ceux possédant des mutations dans les systèmes à deux composantes PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (Cannatelli *et al.* 2014, Lopez-Camacho *et al.* 2014, Olaitan *et al.* 2014, Poirel *et al.* 2015). Une étude génomique conduite par Snitkin *et al.* (Snitkin *et al.* 2013) a permis d'induire des mutations dans plusieurs gènes chez une souche résistante à la colistine. Ces mutations se retrouvaient dans des gènes codant pour des protéines de la membrane et du transport de microcine. Une autre étude a montré trois mutations dans les gènes *waaL*, *rfaA* et *vacJ* chez une souche résistante à la colistine. Tous les précédents gènes sont impliqués dans la synthèse de la membrane externe. Cependant, le lien entre la mutation et la résistance à la colistine reste à confirmer (Snitkin *et al.* 2013). Un autre mécanisme important que l'on retrouve chez *K. pneumoniae* est la production de capsule polysaccharidique. Cette capsule est capable d'attirer et de lier les polymyxines, ce qui réduit par le fait même la quantité de polymyxines au niveau de la membrane externe. Des études ont confirmé que le gène *ugd* nécessaire pour la synthèse de

L-Ara4N joue également un rôle dans la synthèse de la capsule (Campos *et al.* 2004, Clements *et al.* 2007, Llobet *et al.* 2008). Il est possible d'observer deux pompes à efflux, AcrAB et KpnEF qui sont reconnus pour avoir un impact sur la résistance aux polymyxines. Une mutation dans le gène *acrB* entraîne une sensibilité plus importante à la polymyxine B. Cette dernière est expulsée hors de la bactérie par un système énergie dépendant. De la même manière, un mutant KpnEF est plus sensible à la colistine que la souche sauvage (Padilla *et al.* 2010, Srinivasan and Rajamohan 2013).

Chez *A. baumannii*, on ne retrouve pas les fonctions cellulaires nécessaires pour la synthèse de L-Ara4N. Cependant, le mécanisme de résistance le plus étudié est associé aux modifications du LPS par l'ajout du groupement pEtN, lequel est régulé par le système à deux composantes PmrA/PmrB. Comme les autres bactéries précédemment décrites, plusieurs mutations entraînent l'activation constitutive de ce système (Moffatt *et al.* 2010, Arroyo *et al.* 2011, Beceiro *et al.* 2011, Moffatt *et al.* 2011, Lesho *et al.* 2013, Rolain *et al.* 2013). Cependant, un mécanisme semblable à l'ajout du L-Ara4N existe. L'ajout d'un groupement galactosamine sur le lipide A augmente sa charge, réduisant par le fait même l'interaction avec la colistine. La cascade qui engendre cette modification demeure cependant inconnue (Pelletier *et al.* 2013). Une autre étude a rapporté qu'une perturbation (mutations, délétions ou insertions) qui provoque l'inactivation des trois premiers gènes entrant dans la synthèse du LPS soit : *lpxA*, *lpxC* et *lpxD* entraînent la perte complète du LPS. Cette perte de LPS conduit à une résistance à la colistine puisque celle-ci n'a plus de cible (Moffatt *et al.* 2010, Moffatt *et al.* 2011).

Chez *P. aeruginosa*, tout comme chez les autres bactéries précédemment mentionnées, la résistance à la colistine est médiée par des mutations dans les systèmes à deux composantes

PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ ce qui entraîne l'activation constitutive de ces systèmes (McPhee *et al.* 2003, Moskowitz *et al.* 2004, Abraham and Kwon 2009, Moskowitz *et al.* 2012). Cependant, il existe trois autres systèmes à deux composantes pouvant agir sur la modification du LPS soit les systèmes : ParR/ParS (Fernandez *et al.* 2010, Fernandez *et al.* 2012); ColR/ColS et CprR/CprS (Gutu *et al.* 2013). Les systèmes ColR/ColS et CprR/CprS pourraient interagir avec PhoP/PhoQ et amplifier l'activité de *phoQ* et augmenter les modifications du LPS par l'ajout de L-Ara4N. D'autres auteurs proposent cependant que les systèmes ColR/ColS et CprR/CprS réguleraient d'autres gènes pouvant ajouter un L-Ara4N indépendant de PhoP/PhoQ puisque ColR/ColS et CprR/CprS entraînent la résistance à la colistine chez une souche délétée en *phoQ* (Gutu *et al.* 2013). En ce qui concerne le système ParR/ParS, il a été rapporté qu'il peut causer une régulation positive des mutations du LPS en présence de concentrations sous-inhibitrices de polymyxines. De plus, des mutations dans ce système provoqueraient l'expression constitutive de l'opéron *arn* de façon indépendante de PmrA/PmrB (Fernandez *et al.* 2010, Fernandez *et al.* 2012). Chez *P. aeruginosa* il a été démontré que la surexpression de la protéine OprH entraîne une résistance à la colistine. Cette protéine lie le site que les cations divalents occuperaient normalement, réduisant ainsi les sites d'attachement des polymyxines (Young *et al.* 1992). Récemment, une étude a permis d'identifier des gènes (*galU*, *lptC*, *wapR* et *ssg*) qui, lorsque mutés, augmentent la sensibilité aux polymyxines (Fernandez *et al.* 2013), ceci indique que ces gènes jouent un rôle dans la résistance à la colistine.

## **Conclusion et perspectives**



En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence le principal mécanisme de résistance à la colistine chez *E. coli*. Dans la partie *in vitro* de cette étude, nous avons identifié trois nouveaux polymorphismes dans PmrA soit : A80V, N128I et S144G ; ainsi que trois nouveaux polymorphismes dans PmrB soit : V87E, D148Y et D148V. Nous avons également observé trois polymorphismes qui ont déjà été rapportés dans *Salmonella sp.* ou *E. coli* soit G15R dans PmrA et V161G, G53R dans PmrB.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à observer un polymorphisme G53R dans PmrA et T156M dans PmrB chez des souches d'*E. coli* ayant une origine animale (porcine). Nous sommes également les premiers à documenter la stabilité de ces résistances *in vitro*. Ces observations démontrent que la résistance à la colistine en élevage est un enjeu réel en santé publique puisque la colistine est classée comme antibiotique ayant une très haute importance en médecine humaine au Canada.

De plus, plusieurs isolats de *E. coli* ne possédaient pas de mutation dans les gènes *pmrA* et *pmrB*, suggérant d'autres mécanismes de résistance. Dans le futur, il serait intéressant d'investiguer d'autres mécanismes présents chez *E. coli* comme par exemple, le gène *etk* et le petit ARN *mgrR*. Il serait également intéressant d'explorer des mécanismes de résistance que l'on retrouve chez d'autres bactéries à Gram négatif tel que : l'implication de la protéine PmrD dans le système PmrA/PmrB; le phénomène de myristoylation qui semble avoir une importance chez *S. Typhimurium*; la présence de pompe à efflux présent chez *K. pneumoniae*. Ce dernier mécanisme de résistance représente, selon moi, une avenue très importante à explorer car contrairement aux autres mécanismes discutés, celui-ci pourrait se transmettre de manière horizontale car porter sur un plasmide, ce qui augmenterait grandement la résistance à la colistine au sein d'une population (Chancey *et al.* 2012).

Finalement, cette étude illustre l'importance de mieux comprendre le phénomène de l'acquisition de la résistance à la colistine et remet en question l'usage de cet antibiotique en médecine vétérinaire chez le porc, dans un contexte d'usage plus judicieux des antibiotiques.

# **Bibliographie**

- Abraham, N. and D. H. Kwon (2009). "A single amino acid substitution in PmrB is associated with polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Lett **298**(2): 249-254.
- Aguirre, A., S. Lejona, E. G. Vescovi and F. C. Soncini (2000). "Phosphorylated PmrA interacts with the promoter region of *ugd* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium." J Bacteriol **182**(13): 3874-3876.
- Akwar, H. T., C. Poppe, J. Wilson, R. J. Reid-Smith, M. Dyck, J. Waddington, D. Shang and S. A. McEwen (2008). "Associations of antimicrobial uses with antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from pigs on 47 farrow-to-finish farms in Ontario and British Columbia." Can J Vet Res **72**(2): 202-210.
- Alexa, P., K. Stouracova, J. Hamrik and I. Rychlik (2001). "Gene typing of the colonisation factors K88 (F4) in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets." Veterinari Medicina **46**: 46-49.
- Anonyme (2012). Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010. ESVAC. **Second ESVAC report**.
- Anonyme (2014). Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2012 Annual Report. A. d. S. P. d. Canada: 37.
- Arroyo, L. A., C. M. Herrera, L. Fernandez, J. V. Hankins, M. S. Trent and R. E. Hancock (2011). "The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A." Antimicrob Agents Chemother **55**(8): 3743-3751.
- Beceiro, A., E. Llobet, J. Aranda, J. A. Bengoechea, M. Doumith, M. Hornsey, H. Dhanji, H. Chart, G. Bou, D. M. Livermore and N. Woodford (2011). "Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system." Antimicrob Agents Chemother **55**(7): 3370-3379.
- Benedict, R. G. and A. F. Langlykke (1947). "Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*." J Bacteriol **54**(1): 24.
- Bengoechea, J. A. and M. Skurnik (2000). "Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*." Mol Microbiol **37**(1): 67-80.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-250.
- Brown, J. M., D. C. Dorman and L. P. Roy (1970). "Acute renal failure due to overdosage of colistin." Med J Aust **2**(20): 923-924.

Callens, B., D. Persoons, D. Maes, M. Laanen, M. Postma, F. Boyen, F. Haesebrouck, P. Butaye, B. Catry and J. Dewulf (2012). "Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds." Prev Vet Med **106**(1): 53-62.

Campos, M. A., M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. Llompарт, S. Alberti and J. A. Bengoechea (2004). "Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides." Infect Immun **72**(12): 7107-7114.

Cannatelli, A., V. Di Pilato, T. Giani, F. Arena, S. Ambretti, P. Gaibani, M. M. D'Andrea and G. M. Rossolini (2014). "In vivo evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment." Antimicrob Agents Chemother **58**(8): 4399-4403.

Cannatelli, A., T. Giani, M. M. D'Andrea, V. Di Pilato, F. Arena, V. Conte, K. Tryfinopoulou, A. Vatopoulos and G. M. Rossolini (2014). "MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin." Antimicrob Agents Chemother **58**(10): 5696-5703.

Chancey, S. T., D. Zahner and D. S. Stephens (2012). "Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria." Future Microbiol **7**(8): 959-978.

Chauvin, C. (2010). Étude des acquisitions de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques dans un échantillon d'élevages porcins naisseurs-engraisseurs année 2008 et comparaison 2008/2005. ANSES.

Chen, H. D. and E. A. Groisman (2013). "The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications." Annu Rev Microbiol **67**: 83-112.

Cheng, H. Y., Y. F. Chen and H. L. Peng (2010). "Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43." J Biomed Sci **17**: 60.

Choi, C. and C. Chae (1999). "Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea." Vet Microbiol **67**(4): 307-310.

Clausell, A., M. Garcia-Subirats, M. Pujol, M. A. Busquets, F. Rabanal and Y. Cajal (2007). "Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides." J Phys Chem B **111**(3): 551-563.

Clements, A., D. Tull, A. W. Jenney, J. L. Farn, S. H. Kim, R. E. Bishop, J. B. McPhee, R. E. Hancock, E. L. Hartland, M. J. Pearse, O. L. Wijburg, D. C. Jackson, M. J. McConville and R. A. Strugnell (2007). "Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides." J Biol Chem **282**(21): 15569-15577.

Clements, A., J. C. Young, N. Constantinou and G. Frankel (2012). "Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*." Gut Microbes **3**(2): 71-87.

Clifford, R. J., M. Milillo, J. Prestwood, R. Quintero, D. V. Zurawski, Y. I. Kwak, P. E. Waterman, E. P. Lesho and P. Mc Gann (2012). "Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR." PLoS One **7**(11): e48558.

Compendium, N. A. (2015). Canadian Compendium of Veterinary products, 12th edition. Internet, North America Compendiums.

Daudelin, J. F., M. Lessard, F. Beaudoin, E. Nadeau, N. Bissonnette, Y. Boutin, J. P. Brousseau, K. Lauzon and J. M. Fairbrother (2011). "Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs." Vet Res **42**: 69.

Davies, J. and G. D. Wright (1997). "Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics." Trends Microbiol **5**(6): 234-240.

Dean, P. and B. Kenny (2009). "The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell." Curr Opin Microbiol **12**(1): 101-109.

Delgado, M. A., C. Mouslim and E. A. Groisman (2006). "The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the Salmonella O-antigen chain length determinant." Mol Microbiol **60**(1): 39-50.

Dubreuil, J. D. (2008). "*Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle." FEMS Microbiol Lett **278**(2): 137-145.

EcL (2013). APZEC database, EcL Laboratoire de référence pour *Escherichia coli*.

Fairbrother, J. M., E. Nadeau and C. L. Gyles (2005). "*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies." Anim Health Res Rev **6**(1): 17-39.

Falagas, M. E. and S. K. Kasiakou (2005). "Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections." Clin Infect Dis **40**(9): 1333-1341.

Falagas, M. E., P. I. Rafailidis and D. K. Matthaiou (2010). "Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options." Drug Resist Updat **13**(4-5): 132-138.

Fernandez, L., C. Alvarez-Ortega, I. Wiegand, J. Olivares, D. Kocincova, J. S. Lam, J. L. Martinez and R. E. Hancock (2013). "Characterization of the polymyxin B resistance of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **57**(1): 110-119.

Fernandez, L., W. J. Gooderham, M. Bains, J. B. McPhee, I. Wiegand and R. E. Hancock (2010). "Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS." Antimicrob Agents Chemother **54**(8): 3372-3382.

Fernandez, L., H. Jenssen, M. Bains, I. Wiegand, W. J. Gooderham and R. E. Hancock (2012). "The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS." Antimicrob Agents Chemother **56**(12): 6212-6222.

Foster, P. L. (2006). "Methods for determining spontaneous mutation rates." Methods Enzymol **409**: 195-213.

Furrer, B., U. Candrian and J. Luthy (1990). "Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment." Lett Appl Microbiol **10**(1): 31-34.

Ge, M., Z. Chen, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson and D. Kahne (1999). "Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala." Science **284**(5413): 507-511.

Government of Canada (2012). Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2012 Annual Report - Chapter 1. Design and Methods. P. H. A. o. Canada.

Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett and S. I. Miller (1998). "PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance." Mol Microbiol **27**(6): 1171-1182.

Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett and S. I. Miller (1997). "Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ." Science **276**(5310): 250-253.

Gutu, A. D., N. Sgambati, P. Strasbourger, M. K. Brannon, M. A. Jacobs, E. Haugen, R. K. Kaul, H. K. Johansen, N. Hoiby and S. M. Moskowitz (2013). "Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems." Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2204-2215.

Gyles, C. and J. Fairbrother (2009). *Escherichia coli*. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. P. J. Gyles CL, Songer JG, Thoen CO. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA: 267-308

Hale, J. D. and R. E. Hancock (2007). "Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria." Expert Rev Anti Infect Ther **5**(6): 951-959.

Hancock, R. E. (1997). "Peptide antibiotics." Lancet **349**(9049): 418-422.

- Helander, I. M., Y. Kato, I. Kilpelainen, R. Kostianen, B. Lindner, K. Nummila, T. Sugiyama and T. Yokochi (1996). "Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3." Eur J Biochem **237**(1): 272-278.
- Herrera, C. M., J. V. Hankins and M. S. Trent (2010). "Activation of PmrA inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides." Mol Microbiol **76**(6): 1444-1460.
- Holzer, S. U., M. C. Schlumberger, D. Jackel and M. Hensel (2009). "Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*." Infect Immun **77**(12): 5458-5470.
- Ito-Kagawa, M. and Y. Koyama (1980). "Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase." J Antibiot (Tokyo) **33**(12): 1551-1555.
- Jamalludeen, N., R. P. Johnson, R. Friendship, A. M. Kropinski, E. J. Lingohr and C. L. Gyles (2007). "Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*." Vet Microbiol **124**(1-2): 47-57.
- Jamalludeen, N., R. P. Johnson, P. E. Shewen and C. L. Gyles (2009). "Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs." Vet Microbiol **136**(1-2): 135-141.
- Jayol, A., L. Poirel, A. Brink, M. V. Villegas, M. Yilmaz and P. Nordmann (2014). "Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin." Antimicrob Agents Chemother **58**(8): 4762-4766.
- Jones, J. W., S. A. Shaffer, R. K. Ernst, D. R. Goodlett and F. Turecek (2008). "Determination of pyrophosphorylated forms of lipid A in Gram-negative bacteria using a multivariate mass spectrometric approach." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12742-12747.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-140.
- Kato, A., H. D. Chen, T. Latifi and E. A. Groisman (2012). "Reciprocal control between a bacterium's regulatory system and the modification status of its lipopolysaccharide." Mol Cell **47**(6): 897-908.
- Katsunuma, Y., M. Hanazumi, H. Fujisaki, H. Minato, Y. Hashimoto and C. Yonemochi (2007). "Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan." J Gen Appl Microbiol **53**(5): 273-279.



- Katz, E. and A. L. Demain (1977). "The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions." Bacteriol Rev **41**(2): 449-474.
- Kawasaki, K., K. China and M. Nishijima (2007). "Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*." J Bacteriol **189**(13): 4911-4919.
- Kawasaki, K., R. K. Ernst and S. I. Miller (2005). "Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification." J Bacteriol **187**(7): 2448-2457.
- Kempf, I., M. A. Fleury, D. Drider, M. Bruneau, P. Sanders, C. Chauvin, J. Y. Madec and E. Jouy (2013). "What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe?" Int J Antimicrob Agents **42**(5): 379-383.
- Kline, T., M. S. Trent, C. M. Stead, M. S. Lee, M. C. Sousa, H. B. Felise, H. V. Nguyen and S. I. Miller (2008). "Synthesis of and evaluation of lipid A modification by 4-substituted 4-deoxy arabinose analogs as potential inhibitors of bacterial polymyxin resistance." Bioorg Med Chem Lett **18**(4): 1507-1510.
- Koch-Weser, J., V. W. Sidel, E. B. Federman, P. Kanarek, D. C. Finer and A. E. Eaton (1970). "Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy." Ann Intern Med **72**(6): 857-868.
- Koike, M., K. Iida and T. Matsuo (1969). "Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin." J Bacteriol **97**(1): 448-452.
- Kwa, A. L., V. H. Tam and M. E. Falagas (2008). "Polymyxins: a review of the current status including recent developments." Ann Acad Med Singapore **37**(10): 870-883.
- Lacour, S., E. Bechet, A. J. Cozzone, I. Mijakovic and C. Grangeasse (2008). "Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance." PLoS One **3**(8): e3053.
- Landman, D., C. Georgescu, D. A. Martin and J. Quale (2008). "Polymyxins revisited." Clin Microbiol Rev **21**(3): 449-465.
- Lee, H., F. F. Hsu, J. Turk and E. A. Groisman (2004). "The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*." J Bacteriol **186**(13): 4124-4133.
- Lesho, E., E. J. Yoon, P. McGann, E. Snesrud, Y. Kwak, M. Milillo, F. Onmus-Leone, L. Preston, K. St Clair, M. Nikolich, H. Viscount, G. Wortmann, M. Zapor, C. Grillot-Courvalin, P. Courvalin, R. Clifford and P. E. Waterman (2013). "Emergence of colistin-

resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections." J Infect Dis **208**(7): 1142-1151.

Li, Y., L. Chen, X. Wu and S. Huo (2015). "Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers." Poult Sci.

Lim, L. M., N. Ly, D. Anderson, J. C. Yang, L. Macander, A. Jarkowski, 3rd, A. Forrest, J. B. Bulitta and B. T. Tsuji (2010). "Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing." Pharmacotherapy **30**(12): 1279-1291.

Llobet, E., J. M. Tomas and J. A. Bengoechea (2008). "Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides." Microbiology **154**(Pt 12): 3877-3886.

Lopez-Camacho, E., R. Gomez-Gil, R. Tobes, M. Manrique, M. Lorenzo, B. Galvan, E. Salvarelli, Y. Moatassim, I. J. Salanueva, E. Pareja, F. M. Codoner, M. Alvarez-Tejado, M. P. Garcillan-Barcia, F. De la Cruz and J. Mingorance (2014). "Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance." J Antimicrob Chemother **69**(3): 632-636.

Lortie, L. A., J. D. Dubreuil and J. Harel (1991). "Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea." J Clin Microbiol **29**(3): 656-659.

Luppi, A., P. Bonilauri, M. Dottori, Y. Gherpelli, G. Biasi, G. Merialdi, G. Maioli and P. Martelli (2015). "Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy." Transbound Emerg Dis **62**(1): 67-71.

Malik, Y. S., Y. Chander, K. Olsen and S. M. Goyal (2011). "Antimicrobial resistance in enteric pathogens isolated from Minnesota pigs from 1995 to 2004." Can J Vet Res **75**(2): 117-121.

Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere and J. Harel (2003). "Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3214-3221.

McCoy, L. S., Y. Xie and Y. Tor (2011). "Antibiotics that target protein synthesis." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(2): 209-232.

McPhee, J. B., S. Lewenza and R. E. Hancock (2003). "Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **50**(1): 205-217.

Mehta, R. and W. S. Champney (2003). "Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus*." Curr Microbiol **47**(3): 237-243.

- Moffatt, J. H., M. Harper, B. Adler, R. L. Nation, J. Li and J. D. Boyce (2011). "Insertion sequence ISAbal1 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 3022-3024.
- Moffatt, J. H., M. Harper, P. Harrison, J. D. Hale, E. Vinogradov, T. Seemann, R. Henry, B. Crane, F. St Michael, A. D. Cox, B. Adler, R. L. Nation, J. Li and J. D. Boyce (2010). "Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production." Antimicrob Agents Chemother **54**(12): 4971-4977.
- Mogi, T. and K. Kita (2009). "Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics." Cell Mol Life Sci **66**(23): 3821-3826.
- Moon, K. and S. Gottesman (2011). "Competition among Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **82**(6): 1545-1562.
- Moskowitz, S. M., M. K. Brannon, N. Dasgupta, M. Pier, N. Sgambati, A. K. Miller, S. E. Selgrade, S. I. Miller, M. Denton, S. P. Conway, H. K. Johansen and N. Hoiby (2012). "PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1019-1030.
- Moskowitz, S. M., R. K. Ernst and S. I. Miller (2004). "PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A." J Bacteriol **186**(2): 575-579.
- Nagy, B. and P. Z. Fekete (1999). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals." Vet Res **30**(2-3): 259-284.
- Needham, B. D. and M. S. Trent (2013). "Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis." Nat Rev Microbiol **11**(7): 467-481.
- Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton and J. M. Fairbrother (2003). "Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates." J Vet Diagn Invest **15**(3): 242-252.
- Nguyen, F., A. L. Starosta, S. Arenz, D. Sohmen, A. Donhofer and D. N. Wilson (2014). "Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms." Biol Chem **395**(5): 559-575.
- Nishino, K., F. F. Hsu, J. Turk, M. J. Cromie, M. M. Wosten and E. A. Groisman (2006). "Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the Salmonella PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III)." Mol Microbiol **61**(3): 645-654.
- Ojeniyi, B., P. Ahrens and A. Meyling (1994). "Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony

hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays." Zentralbl Veterinarmed B **41**(1): 49-59.

Olaitan, A. O., S. M. Diene, M. Kempf, M. Berrazeg, S. Bakour, S. K. Gupta, B. Thongmalayvong, K. Akkhavong, S. Somphavong, P. Paboriboune, K. Chaisiri, C. Komalamisra, O. O. Adelowo, O. E. Fagade, O. A. Banjo, A. J. Oke, A. Adler, M. V. Assous, S. Morand, D. Raoult and J. M. Rolain (2014). "Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study." Int J Antimicrob Agents **44**(6): 500-507.

Olaitan, A. O., S. Morand and J. M. Rolain (2014). "Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria." Front Microbiol **5**: 643.

Orwa, J. A., C. Govaerts, R. Busson, E. Roets, A. Van Schepdael and J. Hoogmartens (2001). "Isolation and structural characterization of colistin components." J Antibiot (Tokyo) **54**(7): 595-599.

Padilla, E., E. Llobet, A. Domenech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, J. A. Bengoechea and S. Alberti (2010). "Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 177-183.

Pamp, S. J., M. Gjermansen, H. K. Johansen and T. Tolker-Nielsen (2008). "Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes." Mol Microbiol **68**(1): 223-240.

Pelletier, M. R., L. G. Casella, J. W. Jones, M. D. Adams, D. V. Zurawski, K. R. Hazlett, Y. Doi and R. K. Ernst (2013). "Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob Agents Chemother **57**(10): 4831-4840.

Pescaretti Mde, L., F. E. Lopez, R. D. Morero and M. A. Delgado (2011). "The PmrA/PmrB regulatory system controls the expression of the wzzfepE gene involved in the O-antigen synthesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Microbiology **157**(Pt 9): 2515-2521.

Poirel, L., A. Jayol, S. Bontron, M. V. Villegas, M. Ozdamar, S. Turkoglu and P. Nordmann (2015). "The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*." J Antimicrob Chemother **70**(1): 75-80.

Poulikakos, P. and M. E. Falagas (2013). "Aminoglycoside therapy in infectious diseases." Expert Opin Pharmacother **14**(12): 1585-1597.

Quesada, A., M. C. Porrero, S. Tellez, G. Palomo, M. Garcia and L. Dominguez (2015). "Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli*

and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine." J Antimicrob Chemother **70**(1): 71-74.

Raetz, C. R., Z. Guan, B. O. Ingram, D. A. Six, F. Song, X. Wang and J. Zhao (2009). "Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story." J Lipid Res **50 Suppl**: S103-108.

Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent and R. E. Bishop (2007). "Lipid A modification systems in gram-negative bacteria." Annu Rev Biochem **76**: 295-329.

Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky (2010). "Aminoglycoside modifying enzymes." Drug Resist Updat **13**(6): 151-171.

Rogers, M. J. and J. Cohen (1986). "Comparison of the binding of gram-negative bacterial endotoxin by polymyxin B sulphate, colistin sulphate and colistin sulphomethate sodium." Infection **14**(2): 79-81.

Rolain, J. M., S. M. Diene, M. Kempf, G. Gimenez, C. Robert and D. Raoult (2013). "Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France." Antimicrob Agents Chemother **57**(1): 592-596.

Roland, K. L., L. E. Martin, C. R. Esther and J. K. Spitznagel (1993). "Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence." J Bacteriol **175**(13): 4154-4164.

Rubin, E. J., C. M. Herrera, A. A. Crofts and M. S. Trent (2015). "Making the connection: PmrD is required for modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother.

Ryan, K. J., L. I. Schainuck, R. O. Hickman and G. E. Striker (1969). "Colistimethate toxicity. Report of a fatal case in a previously healthy child." Jama **207**(11): 2099-2101.

Rybak, L. P. and V. Ramkumar (2007). "Ototoxicity." Kidney Int **72**(8): 931-935.

Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002). Antimicrobial Compounds,. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. ASM Press. Washington,: 168-186.

Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002). Antimicrobial Compounds,. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. ASM Press. Washington,: 150-167.

Sandvang, D. and F. M. Aarestrup (2000). "Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*." Microb Drug Resist **6**(1): 19-27.

Silver, L. L. (2011). "Challenges of antibacterial discovery." Clin Microbiol Rev **24**(1): 71-109.

Smith, M. G., D. Jordan, T. A. Chapman, J. J. Chin, M. D. Barton, T. N. Do, V. A. Fahy, J. M. Fairbrother and D. J. Trott (2010). "Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea." Vet Microbiol **145**(3-4): 299-307.

Snitkin, E. S., A. M. Zelazny, J. Gupta, T. N. Palmore, P. R. Murray and J. A. Segre (2013). "Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment." Genome Res **23**(7): 1155-1162.

Srinivasan, V. B. and G. Rajamohan (2013). "KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance." Antimicrob Agents Chemother **57**(9): 4449-4462.

Storm, D. R., K. S. Rosenthal and P. E. Swanson (1977). "Polymyxin and related peptide antibiotics." Annu Rev Biochem **46**: 723-763.

Sun, S., A. Negrea, M. Rhen and D. I. Andersson (2009). "Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2298-2305.

Tang, X., C. Tan, X. Zhang, Z. Zhao, X. Xia, B. Wu, A. Guo, R. Zhou and H. Chen (2011). "Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China." Microb Pathog **50**(5): 207-212.

Touze, T., A. X. Tran, J. V. Hankins, D. Mengin-Lecreulx and M. S. Trent (2008). "Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate." Mol Microbiol **67**(2): 264-277.

Tran, A. X., M. E. Lester, C. M. Stead, C. R. Raetz, D. J. Maskell, S. C. McGrath, R. J. Cotter and M. S. Trent (2005). "Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A." J Biol Chem **280**(31): 28186-28194.

Vaara, M. (2010). "Polymyxins and their novel derivatives." Curr Opin Microbiol **13**(5): 574-581.

Vannuffel, P. and C. Cocito (1996). "Mechanism of action of streptogramins and macrolides." Drugs **51 Suppl 1**: 20-30.

Velkov, T., R. L. Soon, P. L. Chong, J. X. Huang, M. A. Cooper, M. A. Azad, M. A. Baker, P. E. Thompson, K. Roberts, R. L. Nation, A. Clements, R. A. Strugnell and J. Li (2013). "Molecular basis for the increased polymyxin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains with under-acylated lipid A." Innate Immun **19**(3): 265-277.

Wang, X. and P. J. Quinn (2010). "Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification." Prog Lipid Res **49**(2): 97-107.

Winfield, M. D. and E. A. Groisman (2004). "Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17162-17167.

Wosten, M. M. and E. A. Groisman (1999). "Molecular characterization of the PmrA regulon." J Biol Chem **274**(38): 27185-27190.

Yahav, D., L. Farbman, L. Leibovici and M. Paul (2012). "Colistin: new lessons on an old antibiotic." Clin Microbiol Infect **18**(1): 18-29.

Yan, A., Z. Guan and C. R. Raetz (2007). "An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*." J Biol Chem **282**(49): 36077-36089.

Young, M. L., M. Bains, A. Bell and R. E. Hancock (1992). "Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques." Antimicrob Agents Chemother **36**(11): 2566-2568.

Zhanel, G. G., P. Chung, H. Adam, S. Zelenitsky, A. Denisuik, F. Schweizer, P. R. Lagace-Wiens, E. Rubinstein, A. S. Gin, A. Walkty, D. J. Hoban, J. P. Lynch, 3rd and J. A. Karlowsky (2014). "Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli." Drugs **74**(1): 31-51.

Zhang, L., P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer and R. E. Hancock (2000). "Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3317-3321.

Zhou, Z., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter, S. I. Miller and C. R. Raetz (2001). "Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation." J Biol Chem **276**(46): 43111-43121.

## **Annexes**



Tableau V : Le code d'acide aminé

Acide aminé	Symbole
Alanine	A
Cystéine	C
Acide aspartique	D
Acide glutamique	E
Phénylalanine	F
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Lysine	K
Leucine	L
Méthionine	M
Asparagine	N
Proline	P
Glutamine	Q
Arginine	R
Sérine	S
Thréonine	T
Valine	V
Tryptophane	W
Tyrosine	Y

